NACHBARSCHAFTSBEZIEHUNGEN DER PENICILLIN-BINDEPROTEINE IN ESCHERICHIA COLI

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

IBRAHIM M. SAID
aus Kairo / Ägypten

1983

UNIV.
LEIDEN

NACHBARSCHAFTSBEZIEHUNGEN DER PENICILLIN-BINDEPROTEINE IN ESCHERICHIA COLI

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

IBRAHIM M. SAID
aus Kairo/Ägypten

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	17.Oktober 1983
Dekan:	Prof. Dr. E. Kulzer
1.Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. J.-V. Höltje
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Dr. Uli Schwarz und Dr. J.-V. Höltje am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen angefertigt. Ihnen und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die anregenden Diskussionen danken.
Meiner Frau Katharina danke ich für ihre Unterstützung, die Arbeit in korrektem Deutsch abzufassen.
Frau I. Baxivanelis danke ich für das sorgfältige Schreiben dieser Arbeit, Frau G. Weinraub für das Zeichnen der graphischen Darstellungen, Frau R. Grömke und Fräulein S. Haase für die ausgezeichneten Photographien.
Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für das gewährte Stipendium.

ABKÜRZUNGEN

A_2pm	Diaminopimelinsäure
DMA	Dimethyladipimidat
DMP	Dimethylpimelimidat
DMS	Dimethylsuberimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DSP	Dithiobis (succinimidylpropionat)
DST	Disuccinimidyltartarat
EGS	Äthylenglykol bis (succinimidylsuccinat)
MG	Molekulargewicht
O.D.	Optische Dichte
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	EINLEITUNG	1
1.	Murein-Aufbau und Biosynthese	2
2.	Penicillin-Bindeproteine	5
3.	Aufbau der Cytoplasmamembran	9
4.	Problemstellung	11
II	MATERIAL UND METHODEN	13
1.	Chemikalien	13
2.	Bakterienstämme und Kulturbedingungen	14
3.	Membran-Präparation	14
4.	Synthese von ^{125}J-Ampicillin	17
5.	Radiomarkierung von Penicillin-Bindeproteinen	18
6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
7.	Isoelektrische Fokussierung	19
8.	Autoradiographie und Fluorographie	20
III	ERGEBNISSE	21
1.	Quervernetzungsversuche mit Membranpräparationen (Zellhüllen)	21
1.1.	Suche nach einem geeigneten Quervernetzungsreagenz	21

1.2. Einfluß der Markierung der Bindeproteine mit Ampicillin auf die Quervernetzungsreaktion. 24
1.2.1. Quervernetzung vor der ^{125}J-Ampicillin-Markierung 24
1.2.2. Quervernetzung nach ^{125}J-Ampicillin-Markierung 26
1.3. Bildung von hochmolekularen Quervernetzungsprodukten 27
1.3.1. Quervernetzung mit Dithiobis (succinimidylpropionat) (DSP) 27
1.3.2. Quervernetzung mit Äthylenglykol-bis (succinimidyl-succinat) (EGS) 30
1.3.3. Quervernetzung mit Disuccinimidyltartarat (DST) 32

2. Quervernetzungsversuche an intakten Zellen 33

3. Quervernetzungsversuche an isolierten Cytoplasmamembranen 36

4. Quervernetzungsversuche mit verschiedenen PBP-Mutanten 39
4.1. Quervernetzung an 1A$^-$ Mutanten 39
4.2. Quervernetzung an 1B$^-$ Mutanten 39
4.3. Quervernetzung an 3$^-$ Mutanten 42
4.4. Quervernetzung an 4$^-$ und 5/6$^-$ Mutanten 42
4.5. Quervernetzung an einer PBP 5-überproduzierenden Mutante 42

5. Analyse der Quervernetzungsprodukte an symmetrischer zweidimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 46
5.1. Versuche mit dem Wildstamm PA 3092 46
5.2. Vergleichsversuche mit Penicillin-Bindeprotein-Mutanten 52

6. Isoelektrische Fokussierung mit anschließender SDS-Gelelektrophorese: eine Möglichkeit, native PBP-Komplexe ohne chemische Quervernetzung nachzuweisen 58

6.1. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung 58

6.2. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 60

6.3. Chemische Quervernetzung des nativen PBP-Komplexes 62

IV DISKUSSION 67

V ZUSAMMENFASSUNG 74

VI LITERATURVERZEICHNIS 76

I EINLEITUNG

Die spezifische Form und die mechanische Stabilität von Bakterien wird von einem Stützskelett aufrechterhalten, das als beutelförmiges Riesenmolekül die Zelle umhüllt (23,68). Diese Murein-Sacculus genannte Struktur ist chemisch ein Polymer aus Glykopeptiden, die zu einem Netz aus Zuckersträngen und Peptidbrücken verknüpft sind. Wachstum und Teilung der Bakterienzelle sind nur möglich, wenn der Murein-Sacculus ständig erweitert und schließlich in zwei Tochtersacculi geteilt wird. Eine Vielzahl von verschiedenen Enzymen ist an diesen Mureinsynthese-Prozessen beteiligt. Die Enzyme müssen einer präzisen Koordination unterliegen, damit die spezifische Form erhalten bleibt und es nicht zur Lyse der Zellen kommt. Wie das Bakterium die Aktivitäten der Enzyme während des Wachstums und der Teilung steuert, ist noch weitgehend unverstanden.

Bekannte Steuermechanismen von komplexen Biosynthesewegen sind die Regulation durch negative Rückkopplung (feed-back), allosterische Kontrolle, Veränderung des Enzymspiegels, begrenzende Metabolite, Substratmodifikation, Kompartimentierung oder die Ausbildung von Multienzym-Komplexen.

Lagern sich die einzelnen Enzyme, die an einem vielstufigen Biosynthesevorgang beteiligt sind, zu einem Komplex zusammen, kann eine koordinierte Regulation der verschiedenen Teilprozesse gewährleistet werden. Ein Beispiel ist der Fettsäure-Synthetase-Komplex der Hefe (6), der sich aus 7 verschiedenen funktionellen Proteinen zusammensetzt. Auch die DNA-Replikation wird von einem Multienzym-Komplex durchgeführt (2). Dieser Komplex, der Primosomenkomplex genannt

wird, ist stabil und kann einige Replikationsrunden überleben. Es liegt nahe zu vermuten, daß Wachstum und Teilung des Murein-Sacculus ebenfalls über Multienzymkomplexe gesteuert werden.

In den nächsten Abschnitten wird a) der Aufbau des Mureins und die an der Mureinbiosynthese beteiligten Enzyme beschrieben; b) zusammengefaßt, was man bis heute über die Penicillin-Bindeproteine weiß und c) der Aufbau der Cytoplasmamembran, in die alle Penicillin-Bindeproteine integriert sind, dargestellt.

1. Murein Aufbau und Biosynthese

Bei den Gram-negativen Bakterien ist das Mureinnetz im Gegensatz zu den Gram-positiven Bakterien einschichtig (9). Der Mureinsacculus (Abb.1) besteht aus Polysaccharidketten, die über Peptidbrücken quervernetzt sind. In den Zuckersträngen, die wahrscheinlich quer zur Längsachse des Bakteriums verlaufen (64), sind N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und ein Milchsäureäther des N-Acetylglucosamins, die N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) in alternierender Folge ß-1,4-glykosidisch miteinander verknüpft. Zu den typischen Aminosäuren, die peptidisch mit der Lactylgruppe der Muraminsäure verknüpft sind und die Peptidbrücken bilden, gehören L-Alanin, D-Glutaminsäure, m-Diaminopimelinsäure (A_2pm) oder L-Lysin und D-Alanin. Die N-Acetylmuraminsäure am potenziell reduzierenden Ende der Zuckerketten ist durch eine intramolekulare 1,6-Anhydrobindung verschlossen (22). Das Murein ist mit der äußeren Membran über ein Lipoprotein verbunden. Etwa jede zehnte Peptidseitenkette ist mit dem endständigen Lysin des Lipoproteins über die freie Carboxylgruppe der

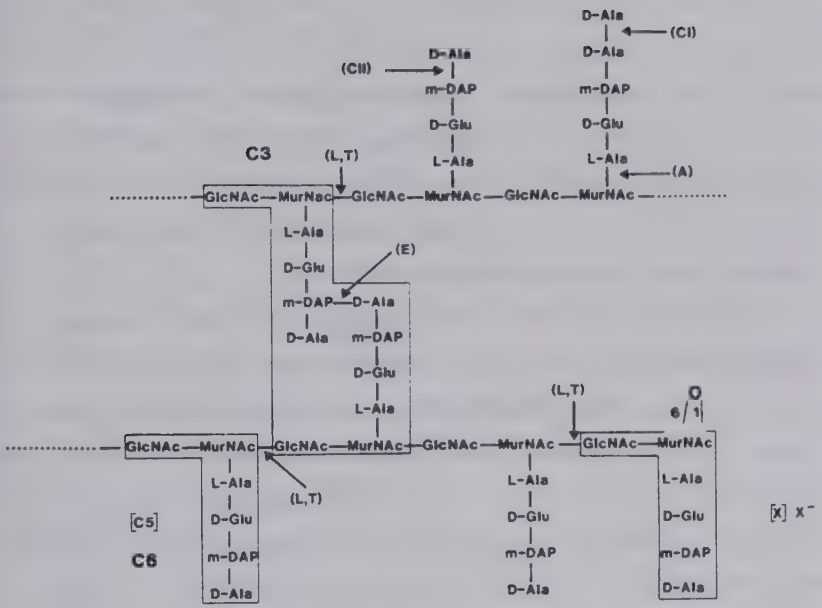


Abb. 1: Struktur des Mureins - Angriffsorte der am Mureinstoffwechsel beteiligten Enzyme

CI: DD-Carboxypeptidase I, CII: LD-Carboxypeptidase II, A: Amidase, E: Endopeptidase, L: Lysozym, T: Transglykosylase

Diaminopimelinsäure verknüpft (8). Es hat sich gezeigt, daß das bisher bekannte Wissen über den Aufbau des Mureins, insbesondere seine Feinstruktur, unvollständig war. Bei Einwirkung von Lysozym wird das Murein in verschiedene Muropeptide gespalten. Für die Identifizierung wurden sie durch Papierchromatographie getrennt. Dabei fallen als Hauptprodukte (ca. 70 % des totalen Mureins), die Muropeptide C3, C5 und C6 (42,44) und in geringen Mengen die Muropeptide X und X´(22) an. Die Strukturen dieser Muropeptide sind in Abb.1 hervorgehoben. Eine große Anzahl bisher unbekannter Muropeptide konnte durch Analyse der Lysozym-Abbauprodukte über Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie nachgewiesen werden (19). Daraus ergibt sich eine weitaus größere Komplexität der Mureinstruktur als bisher angenommen wurde.

Am Mureinstoffwechsel beteiligte Enzyme sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Die Identifizierung und Isolierung verschiedener Mureinhydrolasen ist gelungen. Isoliert wurden zwei Carboxypeptidasen (4,53,60), zwei Endopeptidasen (27,60,62), zwei Transglykosylasen (22,37)und eine Muramylamidase (28,63). Die Carboxypeptidase Ia spaltet das endständige D-Alanin von der Peptidseitenkette ab und verwandelt somit Pentapeptid- in Tetrapeptid-seitenketten. Die Carboxypeptidase II spaltet die Bindung zwischen dem D-Alanin und der Diaminopimelinsäure und bildet damit ein Tripeptid. Die beiden Endopeptidasen, eine lösliche und eine membrangebundene, spalten die Bindung zwischen der Diaminopimelinsäure und dem D-Alanin in der Peptidbrücke. Die beiden Transglykosylasen, die ebenfalls in einer löslichen und einer membrangebundenen Form vorkommen, spalten die glykosidische ß-1,4-Bindung zwischen der N-Acetyl-muraminsäure und dem N-

Acetyl-glucosamin und verwandeln dabei das reduzierende Ende der Muraminsäure in eine 1,6-Anhydro-Bindung. Die Muramyl-amidase spaltet die Amidbindung zwischen der Lactylgruppe der Muraminsäure und dem L-Alanin der Peptidseitenkette. Einige dieser Enzyme binden Penicillin kovalent. Diese und andere Penicillin-bindende Proteine (PBP) sind an der Mureinsynthese beteiligt.

2. Penicillin-Bindeproteine

Spratt beschrieb 1975 sechs Penicillin-Bindeproteine (51), die in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Durch verbesserte Trennmethoden konnten weitere Penicillin-Bindeproteine identifiziert werden. So läßt sich das PBP 1 in eine 1A- und mehrere 1B-Komponenten trennen (52,56,58). Durch Markierung der Membranpräparationen mit ^{125}J-Ampicillin konnten zusätzlich die Bindeproteine 7 und 8 nachgewiesen werden. Die PBPs haben eine essentielle Rolle in der Zellproliferation. Zahlreiche Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung der hochmolekularen PBPs am generellen Mureinwachstum und spezifisch am Längenwachstum der Zelle, an der Bildung des Septums sowie an der Festlegung der spezifischen Stäbchenform hin (51,52).

Wie bereits erwähnt, besteht eine Korrelation zwischen PBPs und den an der Mureinbiosynthese beteiligten Enzymen. Die Enzymaktivitäten sind hauptsächlich durch *in vitro*-Versuche nachgewiesen worden. Die Funktionsweise der PBPs *in vivo* ist noch unverstanden. Im Folgenden werden die PBPs im einzelnen beschrieben. Die wichtigsten Daten sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Penicillin-Bindeproteine von E. coli K 12 (entnommen aus (46))

PBP	Symbol	Position (Min)	Molekular-Gewicht x 10^{-3}	Zahl der Moleküle pro Zelle	Antibiotika, die hohe Binde-Affinität zum PBP zeigen	postulierte Funktion
1A	ponA	73.5	91	230	Cephaloridin/Cefsulodin	Transpeptidase/Transglykosylase; Längenwachstum
1B	ponB/mrc	3.3	86.5-81.5			
2	rodA	14.4	66	20	Mecillinam	Erhaltung der Stäbchenform
3	ftsI	1.8	60	50	Cephalexin Ampicillin	Septumsbildung
4	dacB	68.0	49	110		Endopeptidase/DD-Carboxy-peptidase 1B/1C
5	dacA	13.7	42	1 800	Cefoxitin	DD-Carboxypeptidase 1A
6			40	570		?

PBP 1A und 1B

Cephaloridin zeigt hohe Affinität zu den PBPs 1A/1Bs. Schon bei der niedrigsten wirksamen Konzentration bewirkt dieses ß-Lactam die Lyse der Bakterien. Dies führte zu der Annahme, daß die Penicillin-Bindeproteine 1 eine wichtige Rolle beim generellen Mureinwachstum der Zelle spielen (51). Die Isolierung verschiedener 1A und 1Bs Mutanten (56,58) zeigte, daß sich die PBPs 1A und 1B gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können (52). Das Fehlen beider Proteine ist für die Zelle letal. Isoliertes PBP 1B zeigt Transglycosylase- sowie Transpeptidase-Aktivität (57,38), es ist ein bifunktionelles Enzymprotein. Neuerdings wurden beide Enzymaktivitäten auch in gereinigten Präparationen von PBP 1A nachgewiesen (24).

PBP 2

PBP 2 scheint für die Erhaltung der Stäbchenform von E. coli bedeutsam zu sein (51,50). Mecillinam, das spezifisch an PBP 2 bindet, führt zur Bildung von osmotisch stabilen ovoiden Zellen. PBP 2 temperatursensitive Mutanten wurden isoliert (54). Bei restriktiver Temperatur wachsen die Zellen als Kugeln. Eine enzymatische Reaktion, die durch PBP 2 katalysiert wird, ist bis heute nicht nachgewiesen.

PBP 3

Dem PBP 3 kommt eine große Bedeutung bei der Zellteilung zu. Mutanten mit einem Temperatur-empfindlichen PBP 3 sind bei der restriktiven Temperatur nicht in der Lage, ein Septum zu bilden und wachsen deshalb als Filamente (55,56,61).

Behandlung der Zellen mit niedrigen Konzentrationen verschiedener ß-Lactam-Antibiotika führt ebenfalls zu Filamentbildung und bevorzugter Bindung an das PBP 3. Eine enzymatische Aktivität von PBP 3 *in vitro* nachzuweisen ist schwierig; erst 1981 fanden Ishino und Matsuhashi (6) Murein-synthetisierende Aktivitäten in gereinigten Präparationen von PBP 3. Diese Transpeptidase- und Transglykosylase-Aktivitäten wurden am stärksten durch die ß-Lactame Penicillin G und Cephalexin gehemmt, die vorwiegend an das PBP 3 binden und zu Filamentbildung führen.

PBP 4

E. coli-Mutanten im PBP 4 wurden isoliert (26,35). In diesen Mutanten konnten keine DD-Endopeptidase- und Carboxypeptidase IB-Aktivitäten nachgewiesen werden. Deshalb wird angenommen, daß das PBP 4 mit diesen Enzymaktivitäten identisch ist. PBP 4-Mutanten wachsen normal ohne phänotypische Veränderungen der Zellgestalt oder veränderte Sensitivität gegen Antibiotika. Bindeprotein 4 scheint also keine essentielle Rolle bei diesen Vorgängen zu spielen. *In vivo*-Versuche zur Mureinbiosynthese lassen vermuten, daß das PBP 4, das *in vitro* Carboxypeptidase 1B- und Endopeptidase-Aktivität zeigt, in der intakten Zelle als Transpeptidase wirkt (23). Verfolgt man den Einbau von Diaminopimelinsäure in Murein in Abhängigkeit von der Zeit, so findet man, daß etwa 10 Min lang nur wenig quervernetztes Murein synthetisiert wird; danach steigt die Quervernetzung. Dieser zweite Transpeptidierungsschritt fehlt in PBP 4-Mutanten (14,15).

Neue Arbeiten zeigen, daß die Bindeproteine 5 und 6 wirklich verschiedene Proteine sind und durch verschiedene Gene kodiert werden (36). PBP 5 zeigt Carboxypeptidase-Aktivität. Eine Mutation in dem Gen für das PBP 5 führt zu Akkumulation von Pentapeptiden im Murein (14). Eine Überproduktion an Bindeprotein 5 führt zur Abnahme von Pentapeptideinheiten im Murein (34). PBP 5 wirkt also in vitro und in vivo als DD-Carboxypeptidase. Die Rolle von PBP 6 ist weiterhin unbekannt. Mutanten in PBP 5 oder PBP 6 wachsen normal, aber zeigen eine Überempfindlichkeit gegenüber ß-Lactam-Antibiotika (23). Der Versuch, eine Doppelmutation in beiden Proteinen zu konstruieren, ist bis heute nicht erfolgreich gewesen.

3. Aufbau der Cytoplasmamembran

Die Cytoplasmamembran von Bakterien fungiert als stark selektive Permeations-Barriere für viele Ionen und polare Moleküle. Ein wichtiger Bestandteil biologischer Membranen sind Proteine, die entweder peripher oder integral in einer Lipid Doppelschicht eingebettet sind (Abb.2). Wie die PBPs in die Membran eingelagert sind, ist unbekannt. Die Bildung der Lipid-Doppelschicht ist ein "self assembly"-Prozess. Die gesamten Membranbestandteile werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Die Vorstellungen vom Aufbau einer biologischen Membran sind in dem sogenannten Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson zusammengefaßt (48). Dabei wird angenommen, daß die Proteine statistisch ohne Wechselwirkungen untereinander in der Lipidschicht

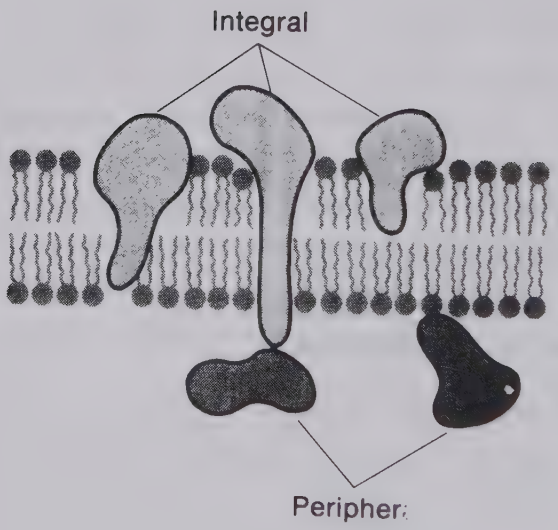


Abb. 2: Aufbau einer biologischen Membran

schwimmen. In einem Modell von Capaldi und Green (10) wird dagegen vorgeschlagen, daß Membranproteine einer starken gegenseitigen Wechselwirkung unterliegen. Membranproteine können aus der Lipid-Doppelschicht durch amphipatische Reagenzien herausgelöst werden. Beispiele für solche Reagenzien sind die Naturprodukte Lysolecithin und Na-deoxycholat, die ionische Detergenzien sind, die synthetischen Detergenzien, wie Triton X-100 und Octylglukoside, die nichtionisch sind, sowie die ionischen Detergenzien Na-dodecylsulfat und Na-Lauroylsarkosinat (Sarkosyl). Sarkosyl, aber auch Triton X-100, solubilisieren spezifisch die Proteine der Cytoplasmamembran und somit auch die PBPs.

4. PROBLEMSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Penicillinbindende Proteine in der Cytoplasmamembran funktionellen Komplexen bilden. Da labile Komplexe während ihrer Extraktion aus der Membran mit Sarkosyl leicht zerfallen könnten, sollten die möglichen Komplexe, vor der Solubilisierung *in situ*, in der Cytoplasmamembran mit bifunktionellen Protein-Quervernetzungsreagenzien chemisch vernetzt werden. Die Verwendung vernetzender Reagenzien ist in vielen Arbeiten beschrieben (18,43,67), in denen die räumliche Anordnung von Polypeptiden in biologischen Komplexen wie z.B. Ribosomen, Zellkernen und in Zellmembranen untersucht wurde. Da diese Reagenzien benachbarte Proteine in definierten Abständen quervernetzen, erlauben sie auch eine Aussage über den gegenseitigen Abstand dieser Proteine in der Membran.

Versuche, Proteine der äußeren Membranen von *E. coli* mit-

einander zu vernetzen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (17,20,41,45) , dies gilt auch für die Proteine der Erythrocytenmembran (33,67). Dabei wurden hauptsächlich Moleküle vom gleichen Proteintyp quervernetzt. Einige Proteine der äußeren Membran von E. coli (Hauptprotein II* und freies Lipoprotein) konnten an die Mureinschicht und an das Lipoprotein gebunden werden.

Versuche, Proteine in der Cytoplasmamembran von E. coli zu vernetzen, sind von vornherein problematisch, da schwer zu interpretieren. Die Cytoplasmamembran von E. coli, enthält im Gegensatz zur äußeren Membran und der Erythrocytenmembran eine Vielzahl verschiedener Proteine. Dazu kommen einige der Proteine nur in geringer Menge vor, was ihre Identifizierung in möglichen Komplexen zusätzlich erschwert. Die Beweglichkeit der Proteine in der Cytoplasmamembran ist außerdem viel höher als die der Proteine der äußeren Membran, so daß nicht nur benachbarte Proteine miteinander quervernetzt werden, sondern auch eine Quervernetzung von zufällig nebeneinander liegenden Proteine stattfinden kann.

Trotz dieser Schwierigkeiten schien es sinnvoll, Komplexe von Penicillin-bindenden Proteinen über chemische Quervernetzung nachzuweisen. Die besondere Eigenschaft dieser Gruppe von Proteinen, Penicillin kovalent zu binden, erlaubt es, sie sehr spezifisch und mit hoher Empfindlichkeit nachzuweisen. Besonders die Verwendung von ^{125}J-markiertem Ampicillin ermöglicht es, auch sehr wenig Penicillin-Bindeproteine in einer großen Menge an Fremdproteinen selektiv zu identifiziere

II MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Chemikalien, die im Folgenden nicht erwähnt sind, wurden von Merck, Darmstadt als p.a. Substanz bezogen.

Quervernetzungsreagenzien

- Äthylenglykol bis (Succinimidylsuccinat)	Pierce Chemical Co. Rockford, Ill.U.S.A.
- Dimethylsuberimidat	"
- Dimethylpimelimidat	"
- Dimethyladipimidat	"
- Dithiobis (Succinimidylpropionat)	"
- Disuccinimidyltartarat	"
- N-Hydroxysuccinimidyl (4-Azidophenyl)-1,3-dithiopropionat)	"
- 1,4-Bis (Maleimidobenzol)	Serva, Heidelberg
- 4-Chlor-3,5-dinitrophenacylbromid	"
- Diäthylpyrocarbonat	"
- 1,3-Difluor-4,6-dinitrobenzol	"
- Dimethyl 3,3-dithiobis-propionimidat	"
- Glutaraldehyd	"

Tartryldiazid, Tartryl-di(glycylazid) und Tartryl-di (aminocaproylazid) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Fasold, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

Sonstiges

- Acrylamid, Bis-Acrylamid	Serva, Heidelberg
- Ampholine	LKB, Schweden; Serva, Heidelberg
- Ampicillin	Bayer, Leverkusen

- Bolton and Hunter-Reagenz	Amersham, U.K.
- Harnstoff, ultra pure	Schwarz & Mann, US
- Intensifying-Folie (Quanta III)	Du Pont, USA
- Kodak X-Omat AR-Film	Kodak, USA
- ^{14}C-Penicillin G	Amersham, U.K.
- Sarkosyl NL-97	Ciba-Geigy, USA
- Triton X-100	Serva, Heidelberg

2. Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Für den größten Teil der Quervernetzungsversuche wurde E. coli K 12 PA 3092 benutzt. Genetische Charakterisierung sowie Herkunft der in den PBP veränderten Mutanten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Der Stamm JE 5703 wurde bei 30°C oder 42°C unter Belüftung in Vollmedium gezüchtet. Das Medium enthielt pro Liter 10 g Bactotrypton, 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl, 120 g Saccharose, 2 g $MgSO_4$ und 40 g A_2pm. Der pH wurde auf 7.4 eingestellt. Der Stamm C 600 pAEB S 1 wurde in Minimal-Citrat-Medium (65) mit Zusatz von 0.2 % Glucose, 20 mg/l L-Threonin, 20 mg/l L-Leucin, 1 mg/l Thiamin und 50 ug/l Vancomycin bei 37°C unter Belüftung gezüchtet, alle anderen Stämme in Antibiotic-Medium No.3 (Difco) mit Zusatz von 50 ug/ml Thymin bei 37°C. Für das Wachstum von A_2pm- und Lys-auxotrophen Mutanten wurden 20 ug/ml A_2pm und 40 ug/ml Lys zugegeben. Die Zellen wurden bei einer OD_{578} von 0.6 - 0.7 ($4-5 \times 10^8$ Zellen/ml) in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase geerntet.

3. Membran-Präparation

Zellen wurden mit 0,01 M Tris-Maleat-Puffer, pH 7.8,

Tabelle 2: Bakterienstämme, genetische Eigenschaften und Herkunft

Stamm	Genotyp	Herkunft
PA 3092	F^-, thr, leu, thi, argH, thyA, his, trp, lacY, mtl, xyl, malA, mel, tonA, str, $supE^+$	Hirota
JE 5703	(ftsI 730, dapA, lysA, thr-1, leu-6, thi-1, argH1, his-1, trp-1, lacY1, malA1, mtl-2, xyl-7, str-9, tonA 2, supE 44, $^-$, F^-)	Hirota
3-19	(HfrC, ponB, tsx, lac, proA, tonA, metB, mal) x (F^-, dacB, tsx, lac, tonA, mtl, mal, str, thy, his, gal)	Suzuki
JE 5731	(ponB 704, F^-, leu, thr?, thi?, argH?, tonA, mtl, xyl, str, malA?, TS 704)	Hirota
JE 5684	(dacB 12, dacA 1191, F^-, dap, Lys Lac^{del}, spc, mtl, xyl, malA)	Hirota
M 3	(F^-, mal^+, str^S, ponA) Pl Transduktion (p4x8, mal, str, thy, his, tonA)	Suzuki
JE 5683	(ponA 980, dacB 12, dacA 1191, F^-, dap, lys, leu?, lac^{del}, spc, mtl, xyl, malA)	Hirota
JE 5631	(ftsI 730, dacB 12, dacA 1191, F^-, leu, metA oder B, thi, ile, mtl, xyl str, his, trp, gal, tsx, proC, lacY, ts)	Hirota
1191 DL	(dap lys Abkömmling von JE 11191) dap, lys	Suzuki

ABDL 2	(Hfr P4x8) dap, lys, his, mal, str, dacA, dacB	Suzuki
DL 64	(dap lys Abkömmling von JE 10064) dap, lys	Suzuki
C600pAEB S1	(thr, leu, thi); dieser Stamm trägt das Plasid pSC 105, mit den Genen kan^r und $dacA^+$	Spratt

gewaschen, und bei einer Zelldichte von 0.4 g/ml im obigen Puffer suspendiert. Der Zellsuspension wurden 40 ug DNase/ml zugegeben und mit 1 g Glasperlen (Durchmesser 0.17 - 0.18 mm, Braun Melsungen) pro 1 ml Suspension 15 Min unter Eiskühlung in einer Bühler Zellmühle (Bühler, Tübingen) geschüttelt. Der Aufschluß der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation (10 Min bei 400 x g) abgetrennt, die Membranen 40 Min bei 48 000 x g abzentrifugiert und zweimal in 0.01 M KPO_4-Puffer pH 6.8, gewaschen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (30), wurden die Membranen in 0.01 M $MgCl_2$, 0.05 M KPO_4-Puffer, pH 7.0, mit einer Konzentration von 10 ug Protein/ml suspendiert. Anschließend wurde die Suspension in kleine Fraktionen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren. Bei einer Lagerung bis zu 3 Monaten konnte kein Aktivitätsverlust in den Penicillin-Bindeeigenschaften festgestellt werden.

4. Synthese von ^{125}J-Ampicillin

Die Synthese wurde nach der Methode von Schwarz et al. (47) durchgeführt. Hundert ug Ampicillin, gelöst in 200 ul 0,1 M Borat-Puffer, pH 8.5, wurden mit 1 mCi Bolton and Hunter-Reagenz 30 Min. bei 0°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Bio-Gel P2-Säule (0.9 x 15 cm) bei 0°C fraktioniert. Achtzig % der eingesetzten Radioaktivität wurde in Ampicillin eingebaut. Das synthetisierte radioaktive ^{125}J-Ampicillin wurde in kleine Portionen aufgeteilt (ungefähr 40 uCi), lyophilisiert und bei -70°C aufbewahrt.

5.Radiomarkierung von Penicillin-Bindeproteinen

Die Radiomarkierung Penicillin-bindender Proteine in Membranpräparationen wurde nach Spratt (50) durchgeführt. Die Membransuspensionen (30ul;10 mg Protein/ml) wurden mit entweder 1 ul(3uCi) ^{125}J-Ampicillin gelöst in Phosphatpuffer, oder mit 5 ul (50 uCi/ml) ^{14}C-Penicillin G, gelöst in H_2O, 10 Min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ul nicht markiertem Ampicillin oder Penicillin G (120 mg/ml) gestoppt.

6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das System von Lugtenberg et al.(31) wurde in modifizierter Form für die Auftrennung von Membranproteinen verwendet. Die Endkonzentration an Bis-Acrylamid betrug beim 10% Acrylamid Trenngel 0,225% statt 0,182% . Die Erhöhung führte zur schärferen Trennung der Banden. Es wurden Flachbettgele von 1 mm Stärke benutzt. Das Sammelgel enthielt 2,5% Acrylamid, das Trenngel 10% bzw. 6,5% Acrylamid. Die Proben wurden nach der Methode von Spratt (5) vorbereitet. Zu einem Volumen von 50 ul Probe wurden 25 ul Spratt-Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 3%SDS, 30% Glycerin, 0,002% Bromphenolblau) und 10 ul Mercaptoäthanol zugegeben. Auf die Zugabe von Mercaptoäthanol wurde in Versuchen mit spaltbaren Quervernetzungsmitteln verzichtet, um eine Spaltung durch Reduktion zu vermeiden. Die Proben wurden dann direkt vor dem Auftragen auf die Gele 3 Minuten gekocht. Die Gele wurden 45 Minuten lang bei einer konstanten Stromstärke von 12,5 mA gehalten, bis die Proben im Sammelgel konzentriert waren. Anschließend wurden die Proben 3-4 Stunden bei 25 mA aufgetrennt. Sobald die Front-

linie das Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt, 30 Minuten gefärbt (1,25g Coomassie brilliant blue R 250 in 454 ml 50%iges Methanol+ 46ml Eisessig) und anschließend mit Entfärbelösung (75ml Eisessig, 50ml Methanol und 875 ml Wasser) entfärbt.

7. Isoelektrische Fokussierung

Es wurde die von O´Farrell beschriebene (39) und von B. Wallenfels (66) modifizierte Methode unter Verwendung horizontaler Flachbettgele (Länge 11 cm,Dicke 1 mm) benutzt. Die Gelzusammensetzung betrug: 2% Triton X-100, 5% (gew/vol) Acrylamid, 0,2% Bis Acrylamid, 9M Harnstoff,5% (gew/vol) Saccharose, 0,1% Ammoniumpersulfat und 8% Ampholin-Gemisch. Als Kathoden-Puffer diente 0,02 M NaOH und als Anoden-Puffer 0,01 M H_3PO_4. Die Gele wurden während der Isofokussierung gekühlt (10^0C). Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: Die Membranen wurden in Lyse-Puffer (9,5 M Harnstoff, 2% (v/v) Triton X 100, 2% Ampholine (pH 3-10)) aufgenommen und 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (100 000 x g., 15 Min) wurde der Überstand in gestanzte Löcher in der Gel-Oberfläche (1,5cm Abstand von der sauren Seite) pipettiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Gele 1 Stunde bei 200 Volt vorbehandelt, um den pH-Gradienten auszubilden. Die Isofokussierung erfolgte 16 Stunden bei einer konstanten Leistung von 0,6 Watt/Gel. Die Gele wurden anschließend in Fixierlösung (30% (vol/vol) Methanol,5% (gew/vol) Sulfosalycylsäure,11,5% (gew/vol) Trichloressigsäure) gehalten und dann 2 Stunden in Färbelösung (10% Essigsäure, 0,1% Coomassie brilliant blue R 250) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch

mehrere Wechsel des Entfärbers (25%Methanol, 16% Essigsäure).

8.Autoradiographie und Fluorographie

Autoradiographie von Proben, markiert mit ^{125}J-Ampicillin wurde wie folgt durchgeführt: Die angefärbten Gele wurden auf Whatman MM3 Papier unter Vakuum getrocknet. Ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR-Film) wurde bei -70°C mit dem Gel 1 bis 10 Tage exponiert. Die zusätzliche Verwendung von "Intensifying"-Folie (Quanta III) verkürzte die Expositionszeit auf etwa 1/5.

^{14}C-Penicillin G-markierte Proben wurden nach der Fluorographie-Methode von Bonner und Laskey (7) exponiert. Die Gele wurden mit Dimethylsulfoxyd (DMSO) entwässert, anschließend mit 80 ml 20 % (w w) PPO in DMSO 2 Std. imprägniert und gewässert. Die Gele wurden getrocknet und mit Röntgenfilmen exponiert, die (um eine Erhöhung der Filmempfindlichkeit zu erreichen) mit Blitzlicht vorbelichtet wurden.

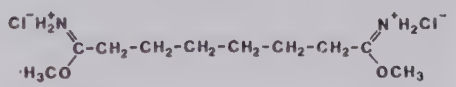
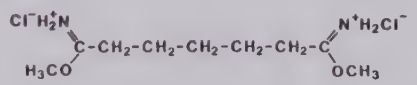
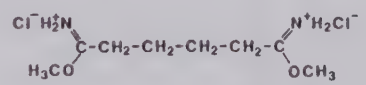
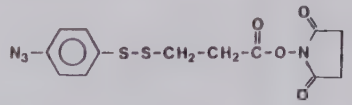
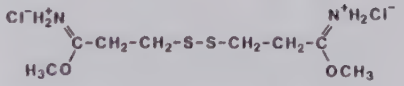
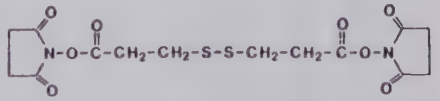
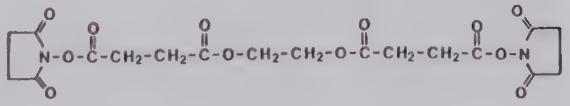
III ERGEBNISSE

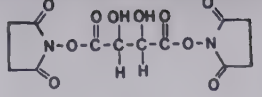
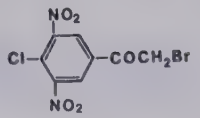
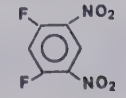
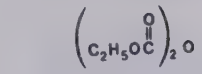
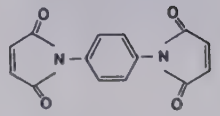
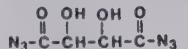
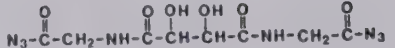
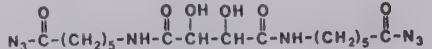
1. Quervernetzungsversuche mit Membranpräparationen (Zellhüllen)

1.1. Suche nach einem geeigneten Quervernetzungsreagenz

Für die Quervernetzungsreaktionen wurden folgende Reaktionsbedingungen aus der entsprechenden Literatur entnommen: Reaktionspuffer, pH, Temperatur, Inkubationszeit und die Reagenzien, mit denen die Reaktionen gestoppt wurden. Die Membranproteinkonzentration wurde in allen Versuchen auf etwa 3 mg/ml eingestellt. Die Konzentration des Quervernetzungsreagenz wurde variiert, um eine optimale Quervernetzung zu erreichen. In der Tabelle 3 sind die einzelnen verwendeten Quervernetzungsmittel aufgeführt. Für die weiteren Versuche wurden Quervernetzungsreagenzien ausgewählt, die zu Veränderungen im Membran-Protein-Muster und in dem Muster der Penicillin-Bindeproteine führen. Diese Reagenzien wurden in Tab. (3) mit + gekennzeichnet. Aus den Quervernetzungsversuchen, die ein positives Quervernetzungsergebnis zeigten, können folgende Schlüsse gezogen werden: Die Reagenz-Konzentration muß so niedrig wie möglich gehalten werden, da eine hohe Konzentration die in der Cytoplasmamembran dicht gepackt vorliegenden Proteine leicht zu sehr großen Komplexen vernetzt, die nicht in das Gel eindringen können. Die Inkubationszeit beeinflußt den Grad der Quervernetzung, wobei die Quervernetzung bei längerer Zeit zunimmt, jedoch treten starke Variationen bei den verschiedene Quervernetzungsmitteln auf. Bei der Auswahl der Reaktionsbedingungen wurde die Stabilität der ß-Lactam-Proteinkomplexe berücksichtigt.Da eine Spaltung der ß-Lactam-Protein-Komplexe durch einen ex-

Tabelle 3 : Testen von verschiedenen Quervernetzungsreagenzien an isolierten Zellhüllen

Quervernetzungs-mittel	Chemische Struktur	Armlänge	spaltbar	Quervernetzer Konzentration µg/100µl	PBP-Quer-vernetzung	Lit.
1. Dimethyl – suberimidat		11 A°	nein	100-250	+	13 ,20
2. Dimethyl – pimelimidat		9.2 A°	nein	200-500	+	13 ,20
3. Dimethyl – adipimidat		8.6 A°	nein	200-500	+	13 ,20
4. N-Hydroxysuccinimidyl (4-azidophenyl)-1,3-dithiopropionat		–	ja	25-250	–	12 , 29
5. Dimethyl 3,3-dithiobis-propionat		–	ja	62-250	–	67
6. Dithiobis (succinimidyl-propionat		12 A°	ja	3-24	+	17 ,45
7. EGS: Äthylenglykol bis (succinimidyl-succinat)		16 A°	ja	5-20	+	1

8. Disuccinimidyl tartarat		6 Å	ja	25-35	+	49
9. 4-Chlor-3,5-dinitrophenacylbromid		-	-	25-500	+	16
10. 1,3-Difluor-4,6-dinitrobenzol		-	nein	125-500	+	33
11. Diäthylpyrocarbonat		-	-	1-20ul	-	5
12. 1,4-Bis (maeleimido) benzol		12-14 Å	nein	50-250	-	11
13. Tartryl-diazid		6 Å	ja	50-800	-	32,41
14. Tartryl-di (glycylazid)		13 Å	ja	50-800	-	32,41
15. Tartryl-di(- aminocproyl-azid		23 Å	ja	50-800	-	32,41
16. Glutaraldehyd		-	nein	0.05-0.25 ul	+	21

tremen pH oder längere Inkubationszeit herbeigeführt werden kann, wurden bei der engeren Auswahl von geeigneten Quervernetzungsmitteln nur solche berücksichtigt, die aufgrund ihrer Reaktionsbedingungen die Stabilität der ß-Lactam-Protein-Komplexe nicht beeinträchtigen.

1.2. Einfluß der Markierung der Bindeproteine mit Ampicillin auf die Quervernetzungsreaktion

Ein wichtiger Faktor bei den Quervernetzungsreaktionen ist der Zeitpunkt der ^{125}J-Ampicillin-Zugabe. Die Abbildung 3 zeigt das Ergebnis von Versuchen, in denen entweder die Quervernetzung vor der Zugabe von ^{125}J-Ampicillin oder nach der Inkubation mit dem radioaktiven ß-Lactam durchgeführt wurde .

1.2.1. Quervernetzung vor der ^{125}J-Ampicillin-Markierung.

Die Membranen (250 ug Protein) wurden in 100 ul 0,2 M Triäthanolamin-HCl-Puffer (mit NaOH auf pH 8 eingestellt) aufgenommen. Die Proben wurden mit 250 ug Dimethylsuberimidat 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in der Beckman Airfuge bei 100 000 x g für 15 Min zentrifugiert und der Rückstand in 25 ul Phosphatpuffer suspendiert. Für die Markierung der Penicillin-Bindeproteine wurden 15 ul ^{125}J-Ampicillin (3 uCi) zugegeben. Die Proben wurden bei 30°C 10 Min inkubiert, die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ul nicht markiertem Ampicillin (120 mg/ml) gestoppt. Durch die Zugabe von Sarkosyl (1 %) wurden spezifisch die Proteine der Cytoplasmamembranen solubilisiert. Der Sarkosyl-Überstand wurde über SDS-Polyacrylamid-Gelelelektrophorese analysiert.

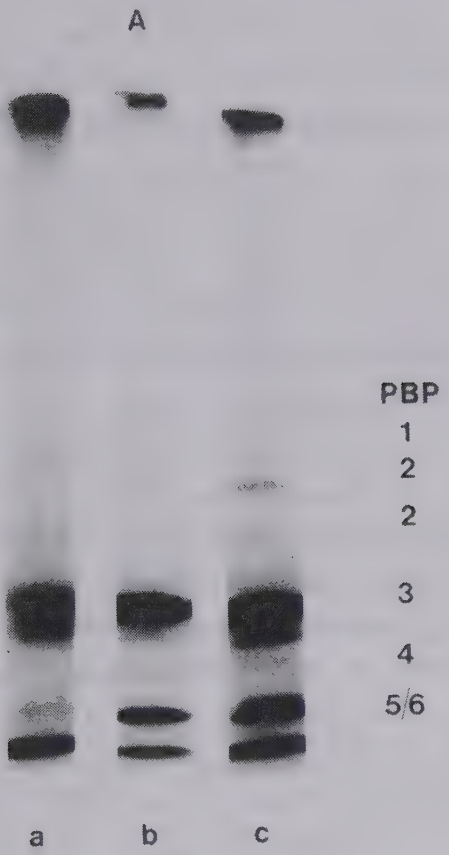


Abb. 3: Penicillin-Bindeproteine aus DMS-quervernetzten Zellhüllen.

Autoradiogramme von SDS-Polyacrylamid-Gelen von Proben, die (a) vor (b) nach der ^{125}J-Ampicillin-Markierung quervernetzt wurden; (c) eine nicht vernetzte Kontrolle.

1.2.2. Quervernetzung nach ^{125}J-Ampicillin-Markierung.

25 ul Membranen (10 mg/ml) wurden durch Inkubation mit 15 ul ^{125}J-Ampicillin (3 uCi) 10 Min bei 30°C markiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ul nicht markiertem Ampicillin (120 mg/ml) gestoppt. Anschließend wurden die Membranen abzentrifugiert und wie oben beschrieben quervernetzt. Nach der Quervernetzung wurden die Membranen abzentrifugiert, in Phosphatpuffer aufgenommen, mit Sarkosyl solubilisiert und der Sarkosylüberstand wie oben beschrieben über SDS-Polyacryl-mid-Gelelektrophorese analysiert.

Die Proben, die vor der ^{125}J-Ampicillin-Markierung quervernetzt wurden, zeigen eindeutig eine starke Abnahme aller Penicillin-Bindeproteine im Vergleich zur Kontrolle (Abb.3). Ein Grund für die generelle Abnahme der Menge an nachweisbaren Penicillin-Bindeproteinen könnte sein, daß die Vernetzung der Proteine die Bindefähigkeit von ^{125}J-Ampicillin beeinträchtigt. Proben, die nach der ^{125}J-Ampicillin-Markierung quervernetzt wurden, zeigen dagegen nur eine geringe Abnahme in der Menge an nachweisbaren PBPs. Die Versuche führen zu der Schlußfolgerung, daß die Quervernetzung von Penicillin-Bindeproteinen die Bindefähigkeit der Bindeproteine für Ampicillin erniedrigt, so daß es sinnvoll ist, die Proteine nach der Markierung mit Ampicillin querzuvernetzen. Trotzdem konnten in Quervernetzungsversuchen, bei denen die Quervernetzung nach der Markierung erfolgte, keine Quervernetzungskomplexe gefunden werden. Das geringe Ausmaß an Quervernetzung kann durch die Zugabe der großen Menge an nicht markiertem Ampicillin, das eine freie Aminogruppe trägt, erklärt werden. Das Ampicillin kann mit den Carboxyl-

gruppen des Quervernetzungsmittels reagieren und es so absättigen.

In den weiteren Versuchen wurde daher auf die Zugabe von unmarkiertem Ampicillin verzichtet.

1.3. Bildung von hochmolekularen Quervernetzungsprodukten

Mit den meisten Quervernetzungsreagenzien konnten keine spezifischen Veränderungen im Penicillin-Bindeproteinmuster gefunden werden. Dagegen wurden hochmolekulare Proteinkomplexe nach Coomassie Blue-Färbung sowie neue Penicillin-Bindeproteinkomplexe nach der Autoradiographie mit folgenden Quervernetzungsmitteln gefunden : Dithiobis (Succinimidylpropionat) (Armlänge 12 A°)), Äthylenglykol-bis (Succinimidylsuccinat) (Armlänge 16 A°) Disucciniminidyltartrat Armlänge 6 A°). Jede dieser Verbindungen bildete spezifische Quervernetzungsprodukte .

1.3.1. Quervernetzung mit Dithiobis (Succinimidylpropionat)

Membranen 25 ul(10 mg Protein/ml) wurden mit 10 ul ^{125}J-Ampicillin (3 uCi) 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in 100 ul 0,2 M Triäthanolamin-HCl (pH 7,5) mit verschiedenen Konzentrationen an Dithiobis (Succinimidylpropionat), gelöst in DMSO, 1 Min. bei Raumtemperatur quervernetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ul 1 M Tris-HCl, pH 8,0, gestoppt. Die Proben wurden 15 Min. in der Beckman Airfuge bei 100 000 x g abzentrifugiert, der Rückstand wurde in 25 ul Phosphatpuffer aufgenommen, mit Sarkosyl (1 %) extrahiert und der Überstand über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

Eine Versuchsreihe mit steigender Konzentration an Di-

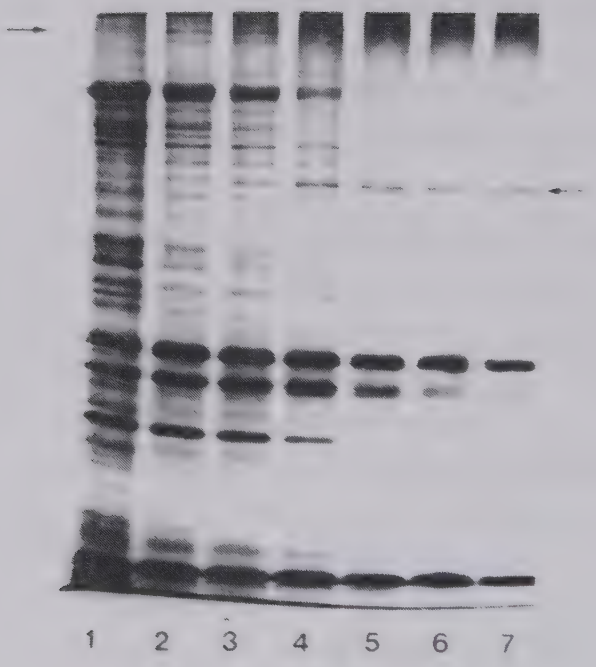


Abb. 4: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine aus Zellhüllen, die mit steigenden Konzentrationen an DSP quervernetzt wurden.

Membranen (250 ug Protein) wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert, anschließend quervernetzt und mit 1 % Sarkosyl extrahiert. Zur Quervernetzung wurden zu den Reaktionsansätzen (100 ul) 1:0 ug, 2:3 ug, 3:6 ug, 4:9 ug, 5: 12 ug, 6:15 ug, 7:18 ug Dithiobis (succinimidylpropionat) zugegeben. Die Proben wurden wie in Material und Methoden beschrieben, aufgetragen und elektrophoriert.

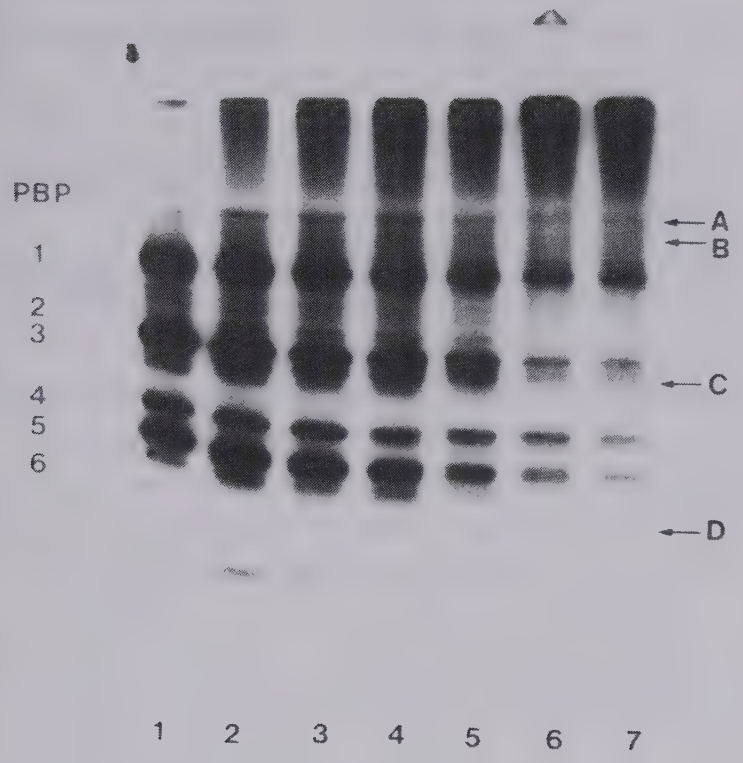


Abb. 5: Penicillin-Bindeproteine aus DSP-quervernetzten Zellhüllen

Autoradiographie der in Abb. 4 dargestellten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

thiobis (Succinimidylpropionat) ist in Abb.4 dargestellt. Neben quantitativen Veränderungen im Proteinmuster treten zusätzliche hochmolekulare Quervernetzungskomplexe auf, die in der Abbildung gekennzeichnet sind (⟶). Mit steigender Konzentration des Quervernetzungsmittels wurden die meisten Banden schwächer, während einige Banden stärker in Erscheinung traten (⟵). Bei sehr hohen Konzentrationen des Quervernetzungsreagenz entstehen weitgehend hochmolekulare Komplexe, die nicht mehr ins Trenngel eindringen. Die Abb.5 zeigt das Penicillin-Bindeproteinmuster dieser Proben. Deutlich sind mehrere hochmolekulare Komplexe erkennbar. Ein Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 140 000 Dalton (A) überlappt mit einer schwachen Bande, die auch in nicht quervernetzten Proben vorhanden ist. Dieser Komplex ist am stärksten sichtbar im Bereich von 3 - 12 ug an Quervernetzungsmittel. Ein weiterer Komplex läuft mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 120 000 Dalton (B). Eine neue Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 57 000 Dalton (C) ist unterhalb von Penicillin-Bindeprotein 3 sichtbar, und ein Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 35 000 Dalton (D) läuft unterhalb von Penicillin-Bindeprotein 6. Bei höheren Konzentrationen des Quervernetzungsmittels gehen die neu aufgetretenen Banden in unspezifische höhere Komplexe über, die am oberen Teil des Gels sichtbar sind.

1.3.2. Quervernetzung mit Äthylenglykol-bis (Succinimidylsuccinat)

Die Membranen wurden wie unter (1.3.1) beschrieben mit ^{125}-Ampicillin markiert. Anschließend wurden die Membranen in 100 ul Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 7,5, aufgenommen und mit

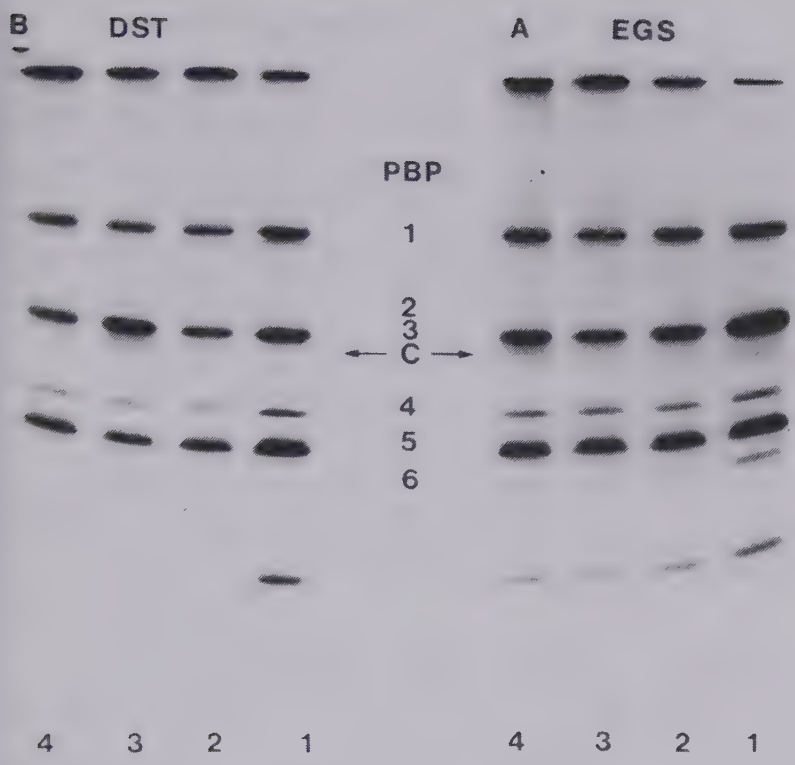


Abb. 6: Autoradiographie der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Penicillin-Bindeproteine aus Zellhüllen quervernetzt mit steigenden Konzentrationen (A) EGS und (B) DST.

Die Membranen wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert, anschließend vernetzt und mit Sarkosyl extrahiert. Zu den Reaktionsansätzen (100 ul) wurden 1:0 ug, 2:5 ug, 3:10 ug, 4:15 ug EGS und 1:0 ug, 2:25 ug, 3:30 ug, 4:35 ug DST zugegeben.

verschiedenen Konzentrationen an Äthylenglykol-bis-succinimidylsuccinat (EGS; gelöst in DMF) für 5 Min im Eisbad quervernetzt. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 40 ul 0,05 M Lysin, pH 7,0, das den Überschuß an Quervernetzungsmittel zerstört. Dabei entstanden hochmolekulare Proteinkomplexe, die in den mit Coomassie Blue-gefärbten Gelen zu sehen sind. Die Abb. (6A) zeigt eine Autoradiographie von Proben quervernetzt mit EGS, im Vergleich zu einer unbehandelten Probe. Im Konzentrationsbereich von 5 - 15 ug EGS tritt die Bande C in Erscheinung, die auch bei der Quervernetzung mit Dithiobis (Succinimidylpropionat) auftritt. Die restlichen Banden, die bei der Quervernetzung mit DSP auftraten, sind hier nicht sichtbar.

1.3.3. Quervernetzung mit Disuccinimidyltartarat (DST)

Der Versuch wurde, wie in den letzten zwei Abschnitten beschrieben, durchgeführt. Nach Aufnahme der ^{125}Jod-Ampicillin markierten Membranen in 100 ul Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,5) wurden verschiedene Mengen (von 25 ug bis 35 ug) des Quervernetzers DST (gelöst in DMSO) zugegeben und 10 Min im Eisbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 ul 1 M Ammoniumacetat gestoppt. Auch in diesem Fall traten in den Coomassie Blue-gefärbten Gelen hochmolekulare Komplexe auf. Die Autoradiographie Abb. (6B) zeigt bei einer Quervernetzungsmittelkonzentration von 30 ug wiederum das Auftreten der Bande C, die auch durch Quervernetzung mit EGS und DSP erhalten wurde.

2. Quervernetzungsversuche an intakten Zellen

Die bisher beschriebenen Versuche wurden ausschließlich an isolierten Zellhüllen durchgeführt. Die Möglichkeit, daß durch die Präparation der Zellhülle topologische Veränderungen der Membranproteine verursacht werden, die zur Ausbildung unphysiologischer Quervernetzungsprodukte führen könnten, wurde durch Versuche an intakten Zellen überprüft.

Für die Quervernetzungsversuche wurden Dimethylsuberimidat (11 A^{o}), Dimethylpimelimidat (9,2 A^{o}), Dimethyladipimidat (8,6 A^{o}), außerdem Dithiobis (Succinimidylpropionat) und Äthylenglykol bis (Succinimidylsuccinat) verwendet. Für die Quervernetzungsversuche wurden zu 100 mg Zellen (geerntet bei OD_{578} ca. 0,7 und in 0,2 M Triäthanolamin-HCl-Puffer suspendiert) steigende Konzentrationen an Quervernetzer (s. Abb.7 u.8) zugegeben. Im Fall der Diimidoester wurde der pH auf 8,0 eingestellt; bei DSP und EGS wurde der pH auf 7,5 eingestellt. Die Inkubation mit den Diimidoestern dauerte 1 Std. bei Raumtemperatur, mit DSP wurde 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert und mit EGS 10 Min bei $0^{o}C$. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 0,01 M Tris-Maleat-Puffer (pH 7,8) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen. Dazu wurde jede Probe (100 mg Zellen in 12 ml Puffer) in einem 100 ml-Becherglas mit dem Ultraschallgerät Labsonic 1510 (Braun, Melsungen) mit dicker Spitze 5 x 30 Sek. bei 300 Watt unter Eiskühlung beschallt. Die Membranen wurden 40 Min bei 48 000 x g abzentrifugiert, der Rückstand wurde in Phosphatpuffer aufgenommen (Proteinkonzentration 10 mg/ml). Die ^{125}J-Ampicillin-Markierung der Membranen sowie die Solubilisierung der Membranproteine wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

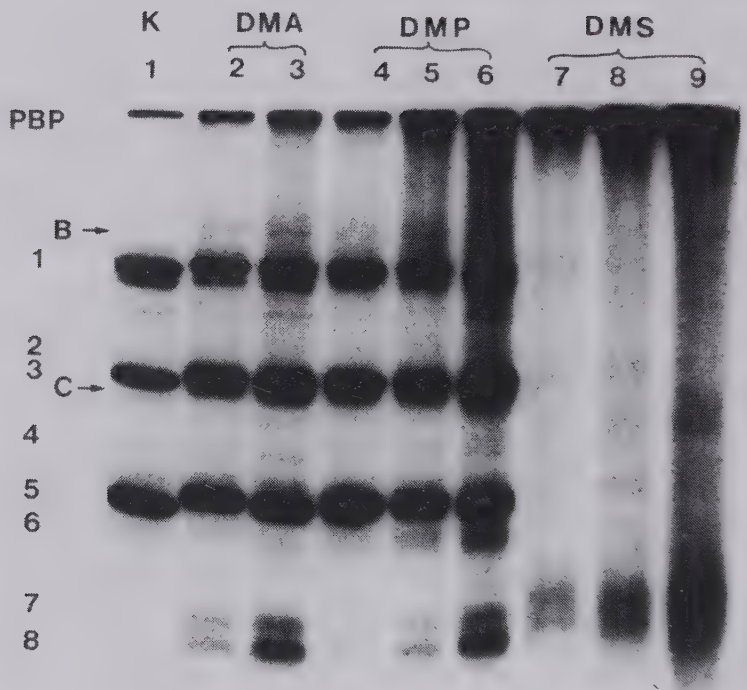


Abb. 7: Quervernetzung von intakten Zellen mit Diimidoestern. (Autoradiographie einer SDS-Gelelektrophorese der Penicilli Bindeproteine)

Zellen (100 mg/ml) wurden 1 Std bei Raumtemperatur mit DMA (1:Kontrolle, 2:10 mg, 3:15 mg), DMP (4:5 mg, 5:10 mg, 6:15 mg) und DMS (7:5 mg, 8:10 mg, 9:15 mg) quervernetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen und mit ^{125}J-Ampicillin markiert.

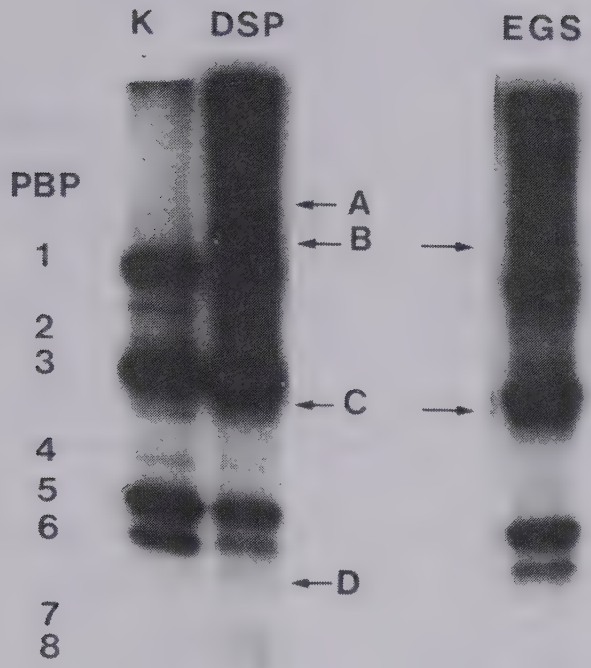


Abb. 8: Quervernetzung von intakten Zellen mit DSP und EGS (Autoradiographie einer SDS-Gelelektrophorese der PBPs)

Zellen (100 mg/ml) wurden mit 100 ug DSP 5 Min bei Raumtemperatur und 500 ug EGS 10 Min bei 0°C quervernetzt. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen und anschließend mit ^{125}J-Ampicillin markiert.

Die Abb. 7 zeigt eine Autoradiographie von Proben, die mit Diimidoestern quervernetzt wurden. Obwohl bei den drei Quervernetzungsmitteln die gleichen Konzentrationen verwendet wurden, zeigen sich Unterschiede im Quervernetzungsgrad, die möglicherweise auf die unterschiedlichen Armlängen der Quervernetzer zurückzuführen sind. Die Quervernetzung an ganzen Zellen mit DMS führt zur Bildung von hochmolekularen Komplexen über 1 Million Dalton, während bei DMP- und DMA-Behandlung oligomere Proteinkomplexe und PBP-Banden auftreten. Mit dem Reagenz DMP werden im Konzentrationsbereich von 10 mg/ml bis 15 mg/ml die Komplexe B und C ausgebildet . Mit DMA sind die gleichen Banden bei einer Konzentration von 15 mg/ml zu sehen. Die Abb.8 zeigt die Autoradiographie von Proben intakter Zellen die mit DSP und EGS quervernetzt wurden. Bei der Quervernetzung mit DSP treten bei einer Konzentration von 0,1 g/ml die Banden A, B, C, und D auf, während bei Quervernetzung mit EGS die Banden B und C bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml sichtbar sind. Ein Nachteil der Quervernetzungsversuche an intakten Zellen ist, daß durch die Gegenwart der gesamten Proteine der Zelle die Quervernetzung eine überaus große Zahl von Quervernetzungsprodukten liefert, was zu einer schlechten Auflösung in der Gelelektrophorese führt. Trotzdem konnte gezeigt werden, daß mit intakten Zellen die gleichen Komplexe gebildet werden wie mit isolierten Zellhüllen.

3. Quervernetzungsversuche an isolierten Cytoplasmamembranen

Das Vorhandensein größerer Mengen an Proteinen bei Quervernetzungsversuchen an ganzen Zellen und an Zellhüllen erschwert die spezifische Quervernetzung benachbarter Cyto-

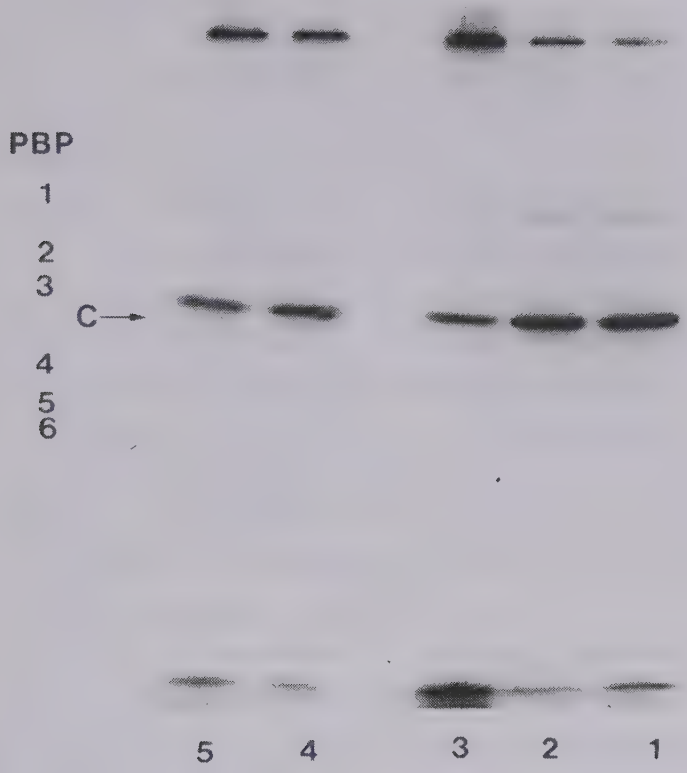


Abb. 9: Quervernetzung von isolierten Cytoplasmamembranen mit DSP (Autoradiographie einer SDS-Gelelektrophorese der PBPs)

Cytoplasmamembranen (100 ug) wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert und anschließend mit DSP (1:0 ug, 2:2ug, 3:6 ug, 4:10 ug, 5:14 ug) in 100 ul Reaktionsvolumen quervernetzt.

plasmamembranproteine und führt zu schlechter Auftrennung in der Gelelektrophorese. Aus diesem Grund wurden Cytoplasmamembranen nach der Osborn-Methode (40) isoliert und wie folgt quervernetzt: isolierte Cytoplasmamembranen (100 ul) mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml wurden mit 3 ul (9 uCi) ^{125}J-Ampicillin versetzt und 10 Min. bei 30^{o}C inkubiert. Für die Quervernetzung wurden verschiedene Konzentrationen des Mittels DSP (Dithiobis (Succinimidylpropionat)) zu den Membranen gegeben (s. Abb.9). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ul 1 M Tris-HCl (pH 8,0) gestoppt. Die weitere Behandlung wurde wie unter Abschnitt (1.3.1) beschrieben durchgeführt. Wie Abb.(9) zeigt, treten bei Quervernetzung an isolierten Cytoplasmamembranen im Vergleich zu isolierten Zelhüllen außer der Bande C keine zusätzlichen Quervernetzungsprodukte auf. Möglicherweise wird nur der Komplex C ausgebildet, weil die Isolationsprozedur der Cytoplasmamembranen zu einer Veränderung der Topographie der Proteine geführt hat. Die Isolation der Cytoplasmamembran hat auch den Nachteil, daß ein genereller Verlust an PBPs festzustellen ist. Weitere Versuche wurden aufgrund dieser Ergebnisse ausschließlich an isolierten Zellhüllen durchgeführt.

4. Quervernetzungsversuche mit verschiedenen PBP-Mutanten

Quervernetzungsversuche mit Dithiobis (Succinimidylpropionat) an Zellhüllen vom Wildstamm PA 3092 führten zum Nachweis von 4 verschiedenen Penicillin-Bindeprotein-Komplexen (siehe Abb.5) nach Quervernetzung . Eine Möglichkeit, diese Komplexe zu charakterisieren ist, die Zellhüllen definierter PBP-Mutanten unter den gleichen Versuchsbedingungen zu untersuchen. Kann einer der Komplexe in Mutanten, denen spezifisch ein Bindeprotein fehlt ,nicht gebildet werden, deutet dies darauf hin, daß das fehlende Bindeprotein an der Ausbildung des Komplexes beteiligt ist. Vor den Quervernetzungsversuchen wurde das PBP-Muster der Mutanten durch ^{125}J-Ampicilin-Markierung überprüft (Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst).

4.1. Quervernetzung an 1A⁻Mutanten

Die Quervernetzung der 1A⁻Mutante JE 5683 ist in Abb. (10) gezeigt. Es entstehen nur die Banden C und D. Die Bande D ist in dieser Mutante nur sehr schwach sichtbar. Die Mutante weist auch eine deutliche Verminderung an PBP 5 auf (Tabelle 4).

4.2. Quervernetzung an 1B⁻Mutanten

Zwei voneinander unabhängige Mutanten im PBP 1B (3-19 und JE 5703) zeigen nach Quervernetzung ebenfalls nur die Banden C und D (Abb.10 u.11). Auffallend ist, daß Mutante 3-19 ohne Quervernetzung eine höhere Menge an PBP 6 aufweist (Tabelle 4).

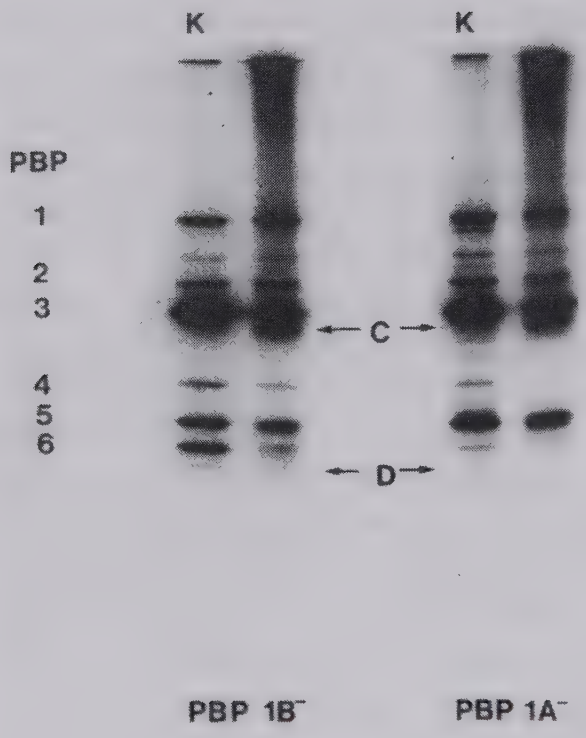


Abb. 10: Quervernetzung der $1A^-$ JE 5683 und der $1B^-$-Mutante JE 5731.

Zellhüllen (250 ug Protein) der einzelnen Mutanten wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert, mit 6 ug DSP in 100 ul Reaktionsvolumen quervernetzt, mit Sarkosyl extrahiert und der Überstand über SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Mutante	Gefundene Menge an PBPs im Vergleich zum Wildstamm								
	1A	1B	2	3	4	5	6	7/8	Mutation
JE 5703	o	o	++	--	-	o	--	o	PBP 3(ts) 42°C
3-19	o	--	+	o	o	o	+	o	PBP $1B^-$ $5/6^-$
JE 5731	o	-	+	o	o	o	o	o	PBP $1B^-$
m 3	o	-	+	o	o	o	o	o	PBP $1A^-$
JE 5683	-	o	+	o	o	o	o	o	PBP $1A^-$, 4^-, $5^-/6^-$
JE 5684	o	o	++	o	-	o	-	o	PBP 4^-, $5/6^-$
JE 5631	o	o	+	o	-	--	-	o	PBP 3(ts), 30°C, 4^-, $5/6^-$
1191 DL	o	o	+	o	o	o	o	o	PBP $5/6^-$
ABDL 2	o	o	+	o	-	o	--	-	PBP 4^-, $5/6^-$
DL 64	o	o	+	o	-	-	--	-	PBP 4^-
C 600 p AEB S1	-	-	o	o	-	+++	-	-	PBP 5^{+++}

o = Menge an PBPs etwa wie beim WT
+ = größere Menge
- = geringere Menge

4.3. Quervernetzung an 3⁻Mutanten

Die Quervernetzungsversuche an der Temperatur-sensitiven PBP 3⁻Mutante JE 5703 wurden durchgeführt mit Membranen von Zellen, die bei 30°C oder bei 42° gewachsen waren (Abb.11). In beiden Fällen ist die Menge an PBP 3 drastisch verringert (fast unsichtbar bei 42°C); außerdem ist PBP 6 in dieser Mutante nicht nachweisbar. Bemerkenswert ist auch die höhere Menge an PBP 2 in dieser Mutante. Durch Quervernetzung entstehen in beiden Fällen die Banden B und D. Die Banden A und C treten nicht auf.

4.4. Quervernetzung an 4⁻ und 5/6⁻Mutanten

In beiden getesteten Mutanten 1191 DL (5/6⁻) und ABDL 2 (4⁻,5/6⁻) werden nach Quervernetzung die Banden B und C gebildet (Abb 12), während die Banden A und D nicht auftreten.

4.5. Quervernetzung an einer PBP5 überproduzierenden Mutante

Die Mutante C 600PAEB S1 produziert die 3 - 5fache Menge an PBP5 (s. Tabelle 4). Wie Abb.(12) zeigt, entstehen die Quervernetzungsprodukte C und D. Auffallend ist die höhere Menge an Bande D, was die Vermutung nahelegt, daß sie aus PBP 5 entsteht.

Aus den Ergebnissen der Quervernetzungsversuche an den verschiedenen Mutanten können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die Entstehung der Bande A durch Quervernetzung erfordert das Vorhandensein der Bindeproteine 1, 3 und 5 in der Menge, die dem Wildtyp entspricht. Eine Inaktivierung der Carboxy-

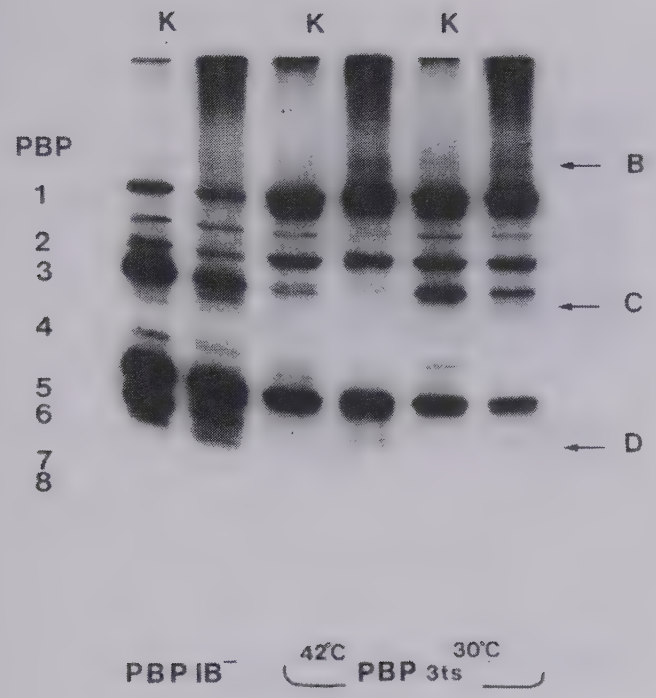


Abb. 11: Quervernetzung der PBP 3(ts)-Mutante JE 5703 und der Bindeprotein $1B^-$-Mutante 3-19

Zellhüllen (250 ug) der PBP 3^{ts}-Mutante, gewachsen bei 42^oC bzw. bei 30^oC, sowie der PBP 1B-Mutante wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert, mit 6 ug DSP in 100 ul Reaktionsvolumen quervernetzt, mit Sarkosyl extrahiert und der Überstand über SDS-Gelelektrophorese analysiert.

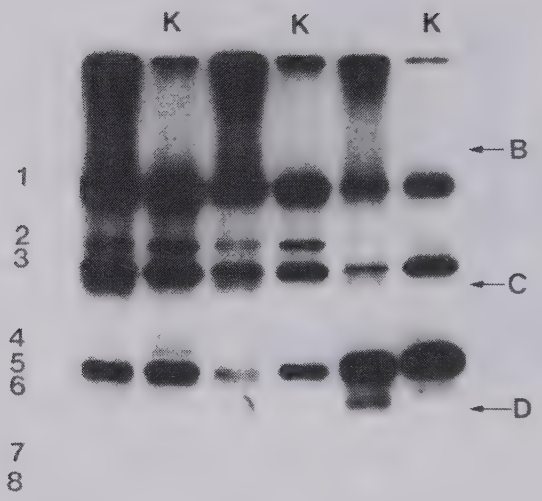


Abb. 12: Quervernetzung des PBP 5-Überproduzenten C 600 PAEB S1, der PBP 4⁻, 5/6⁻-Mutante AB DL 2 und der PBP 5/6⁻-Mutante 1191 DL.

Die Zellhüllen wurden wie in der Legende zu Abb. 11 beschrieben markiert, quervernetzt, extrahiert und in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

peptidase-Aktivität des PBP 5 verhindert ebenfalls die Ausbildung der Bande A.

2. Für die Entstehung der Bande B ist die Anwesenheit von PBP 1A und PBP 1B notwendig, was vermuten läßt, daß diese Bande durch Quervernetzung dieser beiden Proteine entsteht.

3. Die Bande C entsteht bei allen untersuchten Mutanten, mit Ausnahme von PBP3$^-$ Mutanten. Dies führt zu der Annahme, daß die Bande C durch Quervernetzung von PBP 3 entsteht.

4. Wie bereits erwähnt, führt eine Überproduktion von PBP 5 zu einer stärkeren Zunahme der Bande D. Diese Korrelation weist darauf hin, daß die Bande D wahrscheinlich aus PBP 5 gebildet wird.

5. Analyse der Quervernetzungsprodukte mit symmetrischer zweidimensionaler SDS-Polyacrylmid-Gel-Elektrophorese

5.1. Versuche mit dem Wildstamm PA 3092

Die Analyse der Quervernetzungsprodukte in eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese zeigt die Bildung eines PBP-Komplexes mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 140 000 Dalton. Versuche mit Mutanten in den einzelnen PBPs deuteten auf eine Beteiligung der PBP 1,3 und 5 an diesem Komplex. Die Verwendung des spaltbaren Quervernetzungsreagenz DSP ermöglicht, es die Zusammensetzung der Komplexe nach Spaltung direkt aufzuzeigen. Hierzu werden die Komplexe in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Mercaptoäthanol anschließend wieder gespalten und die einzelnen Komponenten in einer 2. Dimension ebenfalls durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden E.coli Membranen mit ^{125}J-Ampicillin markiert, mit Dithiobis (Succinimidylpropionat) quervernetzt und durch 10%ige eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Für die zweite Dimension wurden Streifen (1,5 x 11cm) von gefärbten und wieder entfärbten Gelen ausgeschnitten, und mit 20 mM Tris HCl-Puffer, pH 8,0 neutralisiert. Anschließend wurde der Gelstreifen am Kopf eines zweiten 10%-iges Acrylamidgels in 1%-iger Agarose (enthält 2% Mercaptoethanol) eingebettet. Um eine bessere Konzentrierung der Protein-Banden vor der Auftrennung im Trenngel zu erreichen, wurde ein längeres Sammel-Gel (3.0 cm statt 1,5cm) benutzt. Die Abb.(13) zeigt einen Vergleich zwischen einer quervernetzten Probe und einer Kontrolle. Die quervernetzte Probe zeigt in der ersten Dimension das Auf-

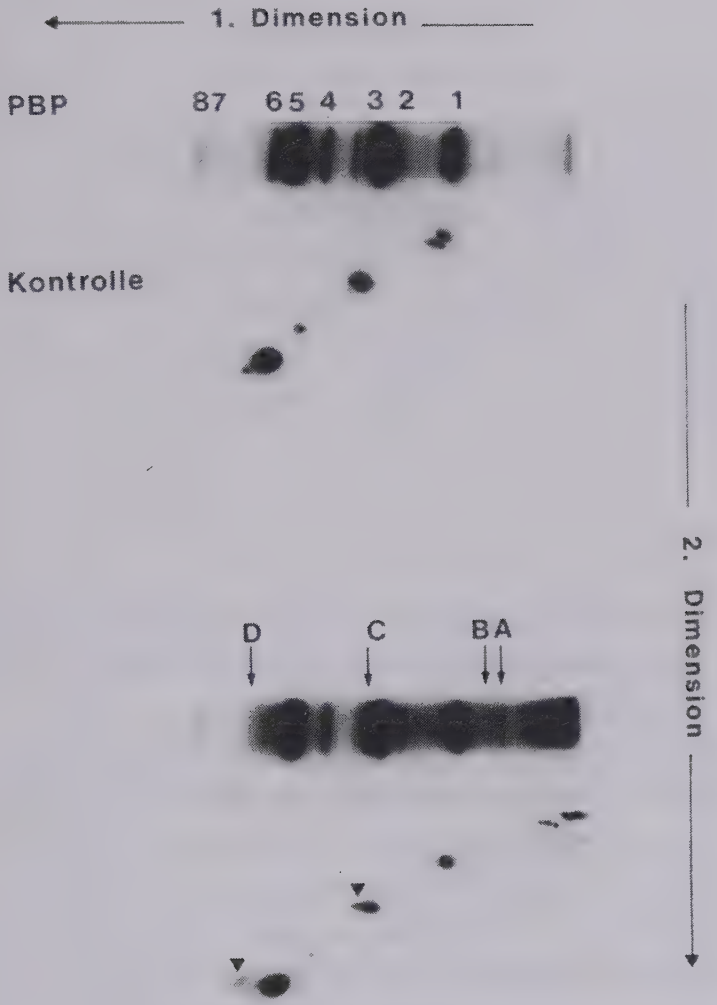

1. Dimension
PBP
87 65 4 3 2 1
Kontrolle
D
C
BA
2. Dimension

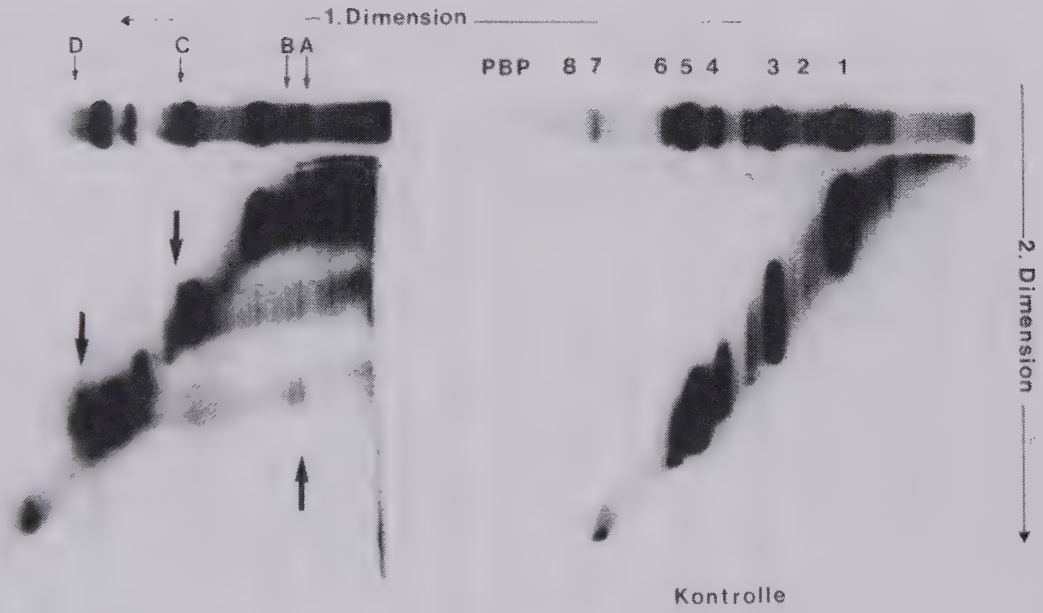
Abb. 13: Autoradiographie einer symmetrischen zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese von PBPs aus mit DSP quervernetzten Zellhüllen.

Zellhüllen (250 ug Protein) von E. coli PA 3092 wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert, mit 6 ug DSP quervernetzt und mit 1 % Sarkosyl extrahiert. Der Überstand wurde in der ersten Dimension auf einem 10 %igem Acrylamidgel elektrophoretisch getrennt und vor der Elektrophorese in die zweite Dimension (identische Bedingungen) mit Mercaptoäthanol gespalten. Für die Konzentrierung der Proteine in der zweiten Dimension wurde ein Sammelgel von 3 anstatt 1,5 cm benutzt. Die Gelstreifen waren vor dem Auftragen auf die 2. Dimension erst gefärbt und dann entfärbt worden.

treten von vier Quervernetzungsprodukten (A, B, C, D,), die in Teil I bereits beschrieben wurden.
Durch die Trennung in der zweiten Dimension unter gleichzeitiger Spaltung der Quervernetzungsprodukte wandern die einzelnen Komponenten der Komplexe entsprechend ihrem Molekulargewicht. Die Bande C wandert an die Position des Penicillin-Bindeproteins 3 und die Bande D an die Position des Penicillin-Bindeproteins 5. Dies bestätigt die Ergebnisse der Mutanten-Versuche, die darauf hingewiesen haben, daß die Quervernetzungsproduke C und D die Penicillin-Bindeproteine 3 bzw. 5 enthalten. Die Analyse der Banden A und B in der zweiten Dimension ist nicht möglich, weil durch den Konzentrierungseffekt des Sammelgels eine seitliche Diffusion verursacht wird, die zu einer Verwischung der einzelnen Banden führt. Deshalb wurde ein anderer Weg beschritten.

Das Gel wurde nach Trennung in der ersten Dimension in Streifen geschnitten (die Gele wurden nicht gefärbt) und sofort in das Agarose-Gel für die Auftrennung in die zweite Dimension eingebettet. Dieser Vorgang dauerte nicht länger als 10 Minuten. Für die Elektrophorese wurde bewußt ein sehr kurzes Sammelgel verwendet (statt 1,5 nur 0,5cm), um eine Konzentrierung, die zur Bandenverbreiterung führt (s. Abb.13), zu vermeiden. Die Banden laufen so als gut voneinander getrennte längliche Streifen in die zweite Dimension. Um die Lauffront zu markieren, wurden einige Tropfen Spratt-Puffer an der Gel-Oberfläche aufgetragen.

Wie die Abb. (14) zeigt, ordnen sich die Penicillin-Bindeproteine in der zweiten Dimension streifenförmig in der Diagonale an. Bei der quervernetzten Probe treten zusätzliche, nicht in der Diagonale liegende Banden auf.



E.COLI PA3092 WILDTYP

Abb. 14: Autoradiographie einer symmetrischen 2-dimensionalen SDS-Gelelektrophorese von PBPs aus quervernetzten Zellhüllen vom Wildstamm E. coli PA 3092.

Zellhüllen (250 ug Protein) wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert, mit 6 ug DSP quervernetzt und mit 1 %igem Sarkosyl extrahiert. Der Überstand wurde in der 1. Dimension auf einem 10 %igem Acrylamidgel elektrophoretisch getrennt und vor der Elektrophorese in die 2. Dimension (identische Bedingungen) mit Mercaptoäthanol gespalten. In der 2. Dimension wurde ein besonders kurzes Sammelgel von 0,5 cm benutzt; dabei werden die Proben nicht konzentriert und laufen in der 2. Dimension als längliche Streifen.

Dies zeigt an, daß diese Proteine ihr scheinbares Molekulargewicht durch die Spaltung verändert haben. Sie sind also aus Quervernetzungskomplexen entstanden. Aus dem Komplex C entsteht eine Bande in Höhe des Penicillin-Bindeproteins 3 und aus dem Komplex D eine Bande in Höhe des Penicillin-Bindeproteins 5. Der Komplex B wandert in der zweiten Dimension in Höhe des Penicillin-Bindeproteins 1, während sich der Komplex A in drei Banden, die genau übereinander liegen, trennt. Diese drei Banden entsprechen in ihrem Molekulargewicht den Penicillin-Bindeproteinen 1, 3 und 5. Dies zeigt, daß der Komplex A aus diesen drei Bindeproteinen besteht. Neben dem Komplex A sind in diesem Bereich weitere Komplexe sichtbar, besonders solche an denen PBP 3 beteiligt ist.

5.2. Vergleichsversuche mit Penicillin-Bindeprotein-Mutanten

Membranen von den beiden Mutanten 3-19 (PBP $1B^-$) und JE 570[illegible] (PBP 3^{ts}, gewachsen bei 42^0C, wurden mit ^{125}J-Ampicillin markiert und mit Dithiobis (Succinimidylproprionat) quervernetzt. Die Quervernetzungsprodukte wurden in der symmetrischen zweidimensionalen SDS-Gel-Elektrophorese analysiert. Die Abb.(15) zeigt einen Vergleich zwischen einer quervernetzten Probe und einer unbehandelten Kontrolle der Mutante 3-19. Durch Quervernetzung entstehen die Komplexe C und D, die wie beim Wildstamm in der zweiten Dimension nach Spaltung an den Stellen der Penicillin-Bindeproteine 3 bzw. 5 erscheinen. Die Abb.(16) zeigt einen Vergleich zwischen einer quervernetzten Probe und einer unbehandelten Kontrolle der Mutante JE 5703. Hier entstehen die Komplexe B und D, die nach der Spaltung in der zweiten Dimension an die Position der Bindeproteine 1 bzw. 5 wandern. Beide Experimente bestätigen

E.COLI 3-19 (PBP 1Bs-)

Abb. 15: Autoradiographie einer symmetrischen 2-dimensionalen SDS-Gelelektrophorese von PBPs aus mit DSP vernetzten Zellhüllen der PBP 1B$^-$-Mutante 3-19.

Die Versuchsbedingungen waren wie in der Legende zu Abb. 14 angegeben.

E.COLI JE5703 (PBP 3-)

Abb. 16: Autoradiographie einer symmetrischen 2-dimensionalen SDS-Gelelktrophorese von PBPs aus mit DSP quervernetzten Zellhüllen der PBP 3(ts)-Mutante JE 5703.

Die Versuchsbedingungen waren wie in der Legende zu Abb. 14 angegeben.

wiederum, daß

a. der Komplex D (35 000 Dalton) aus dem Penicillin-Bindeprotein 5 entstand,

b. der Komplex C (57 000 Dalton) aus dem Penicillin-Bindeprotein 3 entstanden ist,

c. der Komplex B (120 000 Dalton) aus dem Penicillin-Bindeprotein 1 entstand und

d. der Komplex A (140 000 Dalton) sich aus den Penicillin-Bindeproteinen 1, 3 und 5 zusammensetzt.

Zusamenfassend kann gefolgert werden, daß es für die Bildung des Komplexes A notwendig ist, daß alle drei am Komplex beteiligten Bindeproteine in funktionellem Zustand in der Membran vorhanden sind. Fehlt eines der Bindeproteine, wird kein Komplex ausgebildet, auch nicht ein binärer Komplex.

6. Isoelektrische Fokussierung mit anschließender SDS-Gelelektrophorese: eine Möglichkeit native PBP-Komplexe ohne chemische Quervernetzung nachzuweisen

Die Extraktion der Membran-Proteine mit Sarkosyl und das anschließende Kochen der Proben in SDS führt zur Denaturierung der Proteine, so daß mögliche natürlich vorkommende Komplexe zerstört werden. Um solche Komplexe intakt zu lassen, wurden für die isoelektrische Fokussierung die Membranen mit Triton X 100 extrahiert, in der Annahme, daß Proteinkomplexe dabei erhalten bleiben.

6.1. Erste Dimension: Isolelektrische Fokussierung

Zur Trennung der Membranproteine erwies sich das System von O´Farrell (es enthält 9,5 M Harnstoff, und 2% Triton X 100) als besonders geeignet. Wichtig für die Auftrennung der Membran-Proteine in der isoelektrischen Fokussierung ist die Qualität der verwendeten Ampholine sowie die Steilheit des pH-Gradienten. Die Abbildung (17) zeigt das Laufverhalten gleicher Proben, die in Gel-Systemen mit verschiedenen Ampholyten gelaufen sind. Die Versuche wurden wie in Material und Methoden beschrieben, duchgeführt. Es ergibt sich ein eindeutiger Unterschied in der Auflösung der Proteine: breite Protein-Banden bei Verwendung von Serva-Ampholinen (pH 2-11) und scharfe Banden bei LKB-Ampholinen (pH 3,5-10). Die gebildeten pH-Gradienten beider Ampholytgemische sind in Abb. (17) dargestellt.

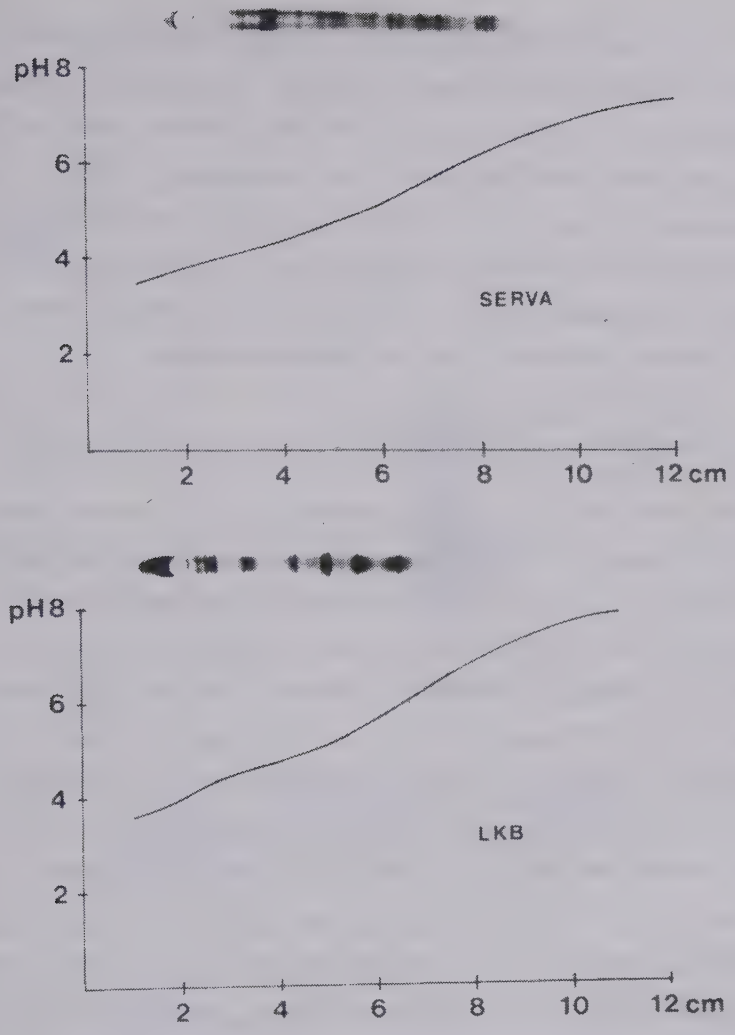


Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung der Cytoplasmamembran-Proteine nach O´Farrell.

Die Proben wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet, auf der sauren Seite des Gels in gestanzte Löcher aufgetragen und bei konstanter Leistung von 0.6 Watt 16 Stdn. lang fokussiert.

Um die Penicillinbindeproteine in dem IEF-Gel-System zu identifizieren, sind folgende Versuche durchgeführt worden: a. Verwendung von verschiedenen Penicillin-Bindeproteinmutanten, bei denen einzelne Penicillin-Bindeproteine fehlen oder überproduziert werden. b. Testen von spezifischen Antikörpern gegen einzelne Penicillin-Bindeproteine. c. Trennung der Penicillin-Bindeproteine in einer zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (SDS-Gel-Elektrophorese).

6.2. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektophorese

Membranen wurden wie unter Abschnitt 1.3.1. beschrieben mit 125 J-Ampicillin markiert, mit Lysis-Puffer (s.Methoden) extrahiert und in der isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt. Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Gel fixiert (5 Stunden), gefärbt (2 Stunden) und nach Entfärbung (über Nacht) in Streifen (1,5cm x 11,5cm) geschnitten. Die Gelstreifen wurden mit mehreren Wechseln von 20 mM Tris-HCL (pH 8) behandelt, um die Fixiersäure zu neutralisieren. Durch diese Behandlung können die Proteine wieder mobilisiert werden. Die Streifen wurden in 1%iger Agarose mit 2% Mercaptoäthanol über ein bereits polymerisiertes 10%iges Acrylamidgel eingebettet. Der Laufpuffer enthielt zusätzlich 2% SDS in der oberen Elektrophoresekammer (Kathode) für die ersten 20 Minuten. Der Kathodenpuffer wurde dann durch normalen Laufpuffer ersetzt. Ansonsten waren die Gelzusammensetzung und die Elektrophoresebedingungen für die Elektrophorese in die zweite Dimension wie in Material und Methoden beschrieben.

Die Abb.(18) zeigt eine Trennung nicht quervernetzter Penicillin-Bindeproteine durch isoelektrische Fokussierung (LKB-Ampholinen pH 3,5 - 10) und durch SDS-Gel-Elektropho-

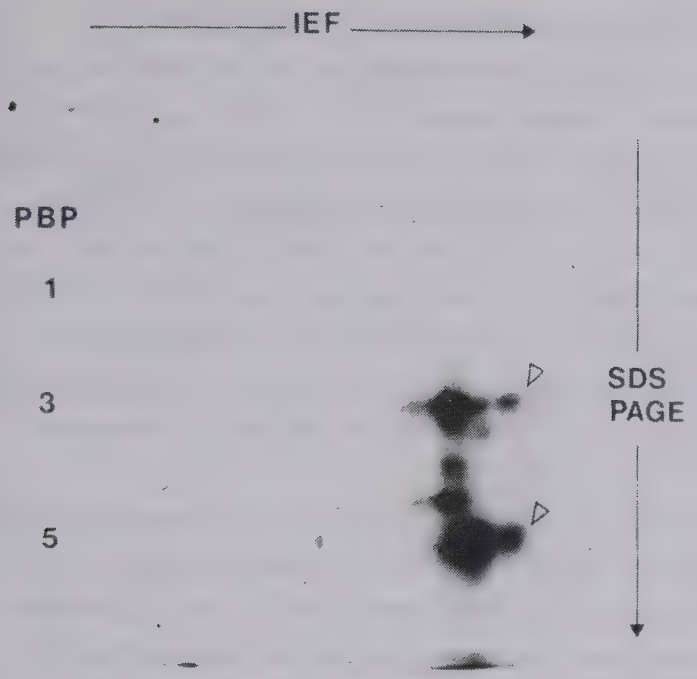


Abb. 18: Triton X-100 solubilisierte PBPs aus Zellhüllen (Autoradiographie eines 2-dimensionalen Gels).

Zellhüllen (250 ug Protein) wurden mit 3 ug ^{125}J-Ampicillin markiert, mit Lyse-Puffer extrahiert, in der 1. Dimension unter Verwendung von LKB-Ampholinen isoelektrisch fokussiert und in der 2. Dimension mit SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

rese. Die Penicillin-Bindeproteine 3 und 5 wandern zu ähnlichen pH -Werten (pH ungefähr 5). In der Position vom Bindeprotein 1 (Molekulargewicht ca. 90 000) ist keine radioaktive Bande sichtbar. An dem Auftragspunkt ausgefallene Proteine könnten das Penicillin-Bindeprotein 1 darstellen, das bereits hier sein radioaktives Penicillin verliert. Ein Grund dafür könnte z.B. der niedrige pH an dieser Stelle sein (pH 3,5). In der zweiten Dimension sind auf der Höhe der Penicillin-Bindeproteine 3 und 5 zusätzliche Banden zu sehen, die aus einer Bande in der Position von pH 5,5 entstanden sind.

Die in Abb.(18) dargestellten Ergebnisse könnten folgendermaßen erklärt werden: Die Penicillin-Bindeproteine 3 und 5 liegen in einem natürlichen Komplex vor. Durch die Trennung mit isoelektrischer Fokussierung zerfällt der größte Teil des Komplexes und die einzelnen Komponenten gelangen an verschiedene isoelektrische Punkte. Ein Teil des Komplexes jedoch bleibt erhalten und wandert bis zum pH 5,5. Wie im folgenden Absatz beschrieben, konnte dieser Komplex durch Quervernetzung stabilisiert werden.

6.3 Chemische Quervernetzung des"nativen PBP-Komplexes"

Die Abb.(19) zeigt einen Parallelversuch zu dem oben beschriebenen, wobei hier die Probe mit Dithiobis (Succinimidylpropionat) quervernetzt wurde. Neben den Penicillin-Bindeproteinen 3 und 5 sind im sauren pH-Bereich des Gels weitere Banden sichtbar, die nach Spaltung zur Bildung von Banden auf der Höhe von 3 und 5 in der zweiten Dimension führen. Diese Komplexe aus 3 und 5 wandern an einen anderen isoelektrischen Punkt als der nicht quervernetzte natürliche

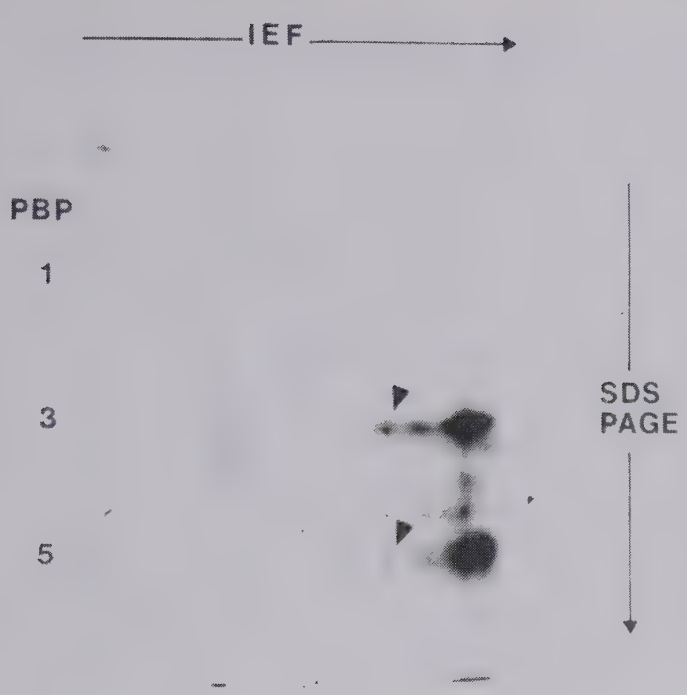


Abb. 19: Triton X-100 solubilisierte PBPs aus DSP-quervernetzten Zellhüllen (Autoradiographie einer 2-dimensionalen Gelelektrophorese)

Zellhüllen (250 ug Protein/100 ul) wurden mit 3 uCi ^{125}J-Ampicillin markiert und mit DSP (6 ug) quervernetzt. Anschließend wurden die Proben mit Lyse-Puffer extrahiert und in der 1. Dimension unter Verwendung von LKB-Ampholine isoelektrofokussiert und mit Mercaptoäthanol gespalten und in der 2. Dimension in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. (▶; aus Komplex entstandene PBPs 3 und 5).

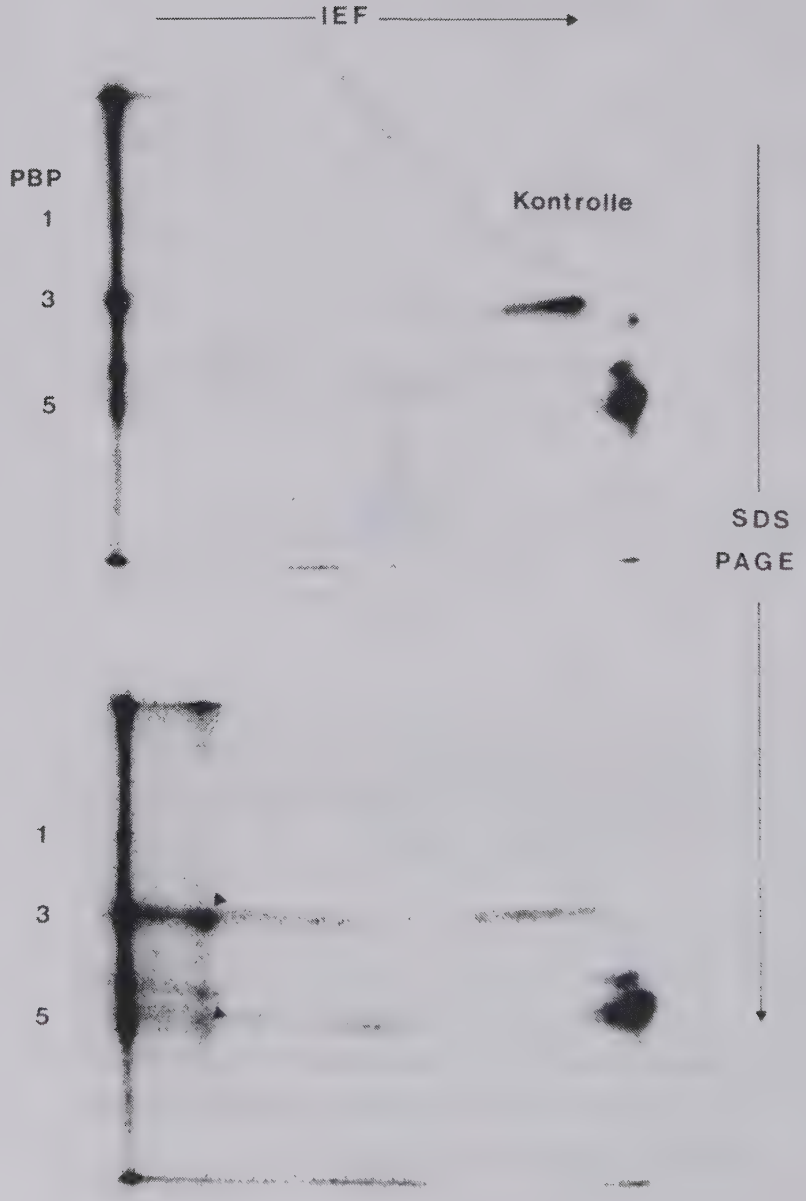

IEF
PBP
1
3
5
Kontrolle
SDS
PAGE
1
3
5

Abb. 20: Triton X-100 solubilisierte PBPs aus DSP quervernetzten Zellhüllen (Autoradiographie einer 2-dimensionalen Gelelektrophorese)

Zellhüllen (250 ug Protein/100 ul) wurden mit 3 uCi ^{125}J-Ampicillin markiert mit DSP (6 ug) quervernetzt (das obere Bild zeigt eine nicht quervernetzte Kontrolle), mit Lyse-Puffer extrahiert und in der 1. Dimension unter Verwendung von Serva-Ampholine isoelektrofokussiert und in der 2. Dimension in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. (▶; aus Komplex entstandene PBPs 3 und 5).

Komplex. Dies ist verständlich, da sich der isoelektrische Punkt des natürlichen Komplexes durch die chemische Quervernetzung sehr wahrscheinlich ändert. Die Banden, die zwischen den Penicillin-Bindeproteinen 3 und 5 erscheinen, können als Abbauprodukte der Penicillin-Bindeproteine angesehen werden, die während der Inkubation mit dem Lysis-Puffer entstanden sind. Die Abb.(20) zeigt den gleichen Versuch wie oben, wobei bei der Fokussierung Serva-Ampholine (pH 2 - 11) verwendet wurden. Auch hier ist durch Quervernetzung ein Komplex entstanden der in der isolelektrischen Fokussierung mit einem IP von ungefähr 4,1 wandert und sich nach Spaltung in der zweiten Dimension in die Penicillin-Bindeproteine 3 und 5 auftrennt. Dies bestätigt, daß die beiden Penicillin-Bindeproteine miteinander quervernetzt werden können.

IV DISKUSSION

Die Quervernetzung von Cytoplasmamembran-Proteinen war technisch schwierig. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen ähnliche Schwierigkeiten (3,33,43). Ein typisches Problem, das bei vielen Quervernetzungsreagenzien auftauchte, war die Vernetzung der Proteine zu hochmolekularen Komplexen (>1 Million Dalton), die die Oberfläche des Trenngels verstopften und damit zu einer unscharfen Auftrennung der Proteine im Gel führte. Um eine begrenzte Quervernetzung in der Cytoplasmamembran zu erreichen, die sich auf eng benachbarte Proteine beschränkt, wurde eine breites Spektrum an bifunktionellen vernetzungsreagenzien bei verschiedenen Konzentrationen getestet. Nur bei drei Reagenzien, Dithiobis (succinimidylpropionat)(DSP), Äthylenglykol bis (succinimidylsuccinat) (EGS) und Disuccinimidyltatarat (DST), konnten Proteine und Komplexe eindeutig getrennt werden.

Mit dem Reagenz DSP wurde ein hochmolekularer Penicillin-Bindeprotein-Komplex mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 140 000 Dalton gebildet. DSP, das eine Armlänge von 12 Å besitzt, war auch erfolgreich bei der Quervernetzung von Proteinen der äußeren Membran verwendet worden (17). Nach Einwirkung von DSP entstanden zusätzlich zu dem normalen Penicillin-Bindeproteinmuster noch weitere drei radioaktive Banden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Neben dem bereits erwähnten Komplex (140 000 Dalton) wurden Komplexe von 120 000 Dalton, 57 000 und 35 000 Dalton gebildet. Diese entstanden bei Quervernetzung von Zellhüllen. Sie konnten aber auch durch Quervernetzung an intakten Zellen erhalten werden. Bei Quervernetzungsversuchen mit isolierter Cytoplas-

mamembran entstand nur der Komplex C (MG: 57 000). Die anderen Komplexe sind möglicherweise während der Isolierungsprozedur der Cytoplasmamembran verloren gegangen. Dafür spricht, daß auch die Penicillin-Bindeproteinmuster der Kontrollen eine eindeutige Abnahme der meisten Bindeproteine im Vergleich zu isolierten Zellhüllen zeigten. Der Verlust von Penicillin-Bindeproteinen während der Isolierung der Cytoplasmamembranen deutet darauf hin, daß diese Proteine hauptsächlich peripher an die Cytoplasmamembran angelagert sind; dies ist für ihre Funktion bei der Mureinsynthese sinnvoll.

Außer mit unspezifischen Quervernetzungsreagenzien könnten Komplexe aus Penicillin-Bindeproteinen auch mit Quervernetzern nachgewiesen werden, die spezifisch an Penicillin-Bindeproteine binden. Denkbar wäre, ein Bis-ß-Lactam zu benutzen. Es besteht aber die Gefahr, daß bei Verwendung solcher bis-ß-Lactam-Quervernetzer die in der Membran beweglichen Penicillin-Bindeproteine herausgefischt werden und so keine Aussage über die wahren Nachbarschaftsverhältnisse gemacht werden kann. Sinnvoller wäre die Verwendung eines Mono-ß-Lactam-Quervernetzers, der an einer Seite ein Ampicillin oder ein anderes Penicillin-Derivat und an der anderen Seite eine unspezifische reaktive Gruppe trägt, die beliebig mit verschiedenen anderen Proteinen reagieren kann. Die Synthese solcher Mono-ß-Lactam-Vernetzer wurde gleichzeitig in unserer Arbeitsgruppe und in der Arbeitsgruppe von Aran durchgeführt. Aran berichtet (3), daß Quervernetzungsversuche mit einem Mono-ß-Lactam-Quervernetzer keine Hetero-Komplexe von Bindeproteinen ausbildet. Es entstanden nur Komplexe aus Molekülen gleichen Typs.

Für die Charakterisierung der vier mit DSP gebildeten

Komplexe nutzten wir die Verfügbarkeit von spezifischen Mutanten in den einzelnen Penicillin-Bindeproteinen. Da die Sulfidbindung in DSP leicht durch Mercaptoäthanol gespalten werden kann, konnten wir zusätzlich die am Komplex beteiligten Proteine nach Reduktion direkt in einer zweiten SDS-Gelelektrophorese identifizieren. Beide Methoden zeigten Ergebnisse, die sich gegenseitig bestätigen: Der Komplex A enthält die Penicillin-Bindeproteine 1, 3 und 5; der Komplex B kann nur gebildet werden, wenn sowohl Penicillin-Bindeprotein 1A als auch Penicillin-Bindeprotein 1B vorhanden sind; die Komplexe C und D sind aus dem Penicillin-Bindeprotein 3 bzw. 5 entstanden.

Die beiden Komplexe C und D weisen niedrigere scheinbare Molekulargewichte auf als die Bindeproteine, aus denen sie gebildet sind. Die Beteiligung anderer Proteine an diesen Komplexen ist daher unwahrscheinlich. Die Erniedrigung des scheinbaren Molekulargewichts kann durch intramolekulare Quervernetzung erklärt werden, die eine Entfaltung der Proteine in SDS verhindert, damit die Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-Gelelektrophorese erhöht und so ein niedrigeres Molekulargewicht vortäuscht. Die Bildung solcher intramolekularer Verbindungen durch Quervernetzung ausschließlich bei den beiden Bindeproteinen 3 und 5 könnte auf eine ähnliche räumliche Struktur der beiden Proteine in der Cytoplasmamembran hinweisen.

Da der Komplex B (MG: 120 000 Dalton) beim Fehlen eines der beiden Bindeproteine 1A oder 1B nicht gebildet wird, liegt die Vermutung nahe, daß 1A und 1B miteinander durch Quervernetzung den Komplex B bilden. Die Summe der Molekular-

gewichte der beiden Proteine liegt aber höher als das scheinbare Molekulargewicht, das für den Komplex B bestimmt wurde. Ungewöhnliches Laufverhalten von Membranproteinen in der SDS-Gelelektrophorese ist aber nicht so selten . Die Quervernetzung könnte außerdem, wie für die intramolekularen Komplexe C und D schon besprochen, die Entfaltung auch dieses Komplexes verhindern und ein niederes scheinbares Molekulargewicht vortäuschen. In zweidimensionalen Gelen ließen sich 1A und 1B in der zweiten Dimension nicht sauber voneinander trennen, so daß das Vorhandensein von 1A und 1B in dem Komplex nicht direkt sichtbar gemacht werden konnte.

Die Identifizierung der Komponenten in Komplex A ist eindeutig; er enthält die Bindeproteine 1, 3 und 5. Bei Quervernetzungsversuchen mit mutierten Proteinen entstand dieser Komplex nicht. Auch bei Mutanten mit reduzierter Menge eines dieser Penicillin-Bindeproteine wurde der Komplex nicht beobachtet. Ein Beispiel ist die Mutante C600 pAEBS1, die Penicillin-Bindeprotein 5 in höheren Mengen produziert, jedoch geringere Mengen an Penicillin-Bindeprotein 1 aufweist. Ein zweites Beispiel ist die Penicillin-Bindeprotein 3 ts-Mutante, bei der bei einer Wachstumstemperatur von 42^{o}C kein Bindeprotein 3 nachweisbar ist, und bei einer Wachstumstemperatur von 30^{o}C nur geringe Mengen . In beiden Fällen konnte der Komplex A nicht nachgewiesen werden. Aus den gleichen Gründen wie beim Komplex B ließ sich nicht entscheiden, ob sowohl 1A als auch 1B oder nur eines dieser Proteine am Komplex beteiligt sind. Versuche mit Mutanten ergaben jedoch, daß nur bei Anwesenheit beider Proteine der Komplex entsteht. Eine mögliche Beteiligung auch der Bindeproteine 2 und 4 an

dem Komplex kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, da die Mengen an diesen Bindeproteinen gering und in der zweiten Dimension nicht nachweisbar sind. Komplexe mit anderen, nicht-Penicillin -bindenden Protein sind auf den Gelen deutlich sichtbar (Abb.14).

Die Bildung des Komplexes A deutet auf eine enge Nachbarschaft der Bindeproteine 1, 3 und 5 hin. Der maximale Abstand zwischen diesen drei Proteinen kann entsprechend der Armlänge des Quervernetzers nicht wesentlich mehr als 12 Å betragen. Es ist schwierig, das tatsächliche Molekulargewicht für den Komplex A zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, kann eine Quervernetzung das scheinbare Molekulargewicht der Proteine verringern. Das scheinbare Molekulargewicht für den Komplex A beträgt 140 000 Dalton. Die Summe der Molekulargewichte der am Komplex beteiligten Bindeproteine 1, 3 und 5 ergibt einen Wert von 190 000 Dalton. Das Molekulargewicht des Komplexes könnte bedeuten, daß der Komplex A stöchiometrisch aus den Bindeproteinen 1, 3 und 5 aufgebaut ist.

Wird ein stöchiometrischer Komplex angenommen, wäre der limitierende Faktor für die mögliche Gesamtmenge des Komplexes das Bindeprotein mit der geringsten Molekülzahl in der Zelle. Das wäre das Bindeprotein 3, das mit ca. 50 Kopien pro Zelle vorkommt (50). Nach der Quervernetzungsreaktion jedoch ist der größte Teil des Bindeproteins 3 noch frei vorhanden. Wie die Autoradiogramme zeigen, ist die Ausbeute an Komplex A in der Quervernetzungsreaktion sehr niedrig. Demnach besteht die Möglichkeit, daß der Komplex A durch zufällige Kollision der, in der Membran lateral diffundierenden Bindeproteine entstanden ist. Um dies auszuschließen, wurde versucht, den

nativen Komplex ohne vorherige chemische Quervernetzung zu isolieren. Tatsächlich existiert ein Komplex, der Penicillin-Bindeproteine 3 und 5 enthält. Das Bindeprotein 1 war nicht auffindbar, es wird möglicherweise in der isoelektrischen Fokussierung am Auftragspunkt denaturiert. Wurden die Proben bei anderen pH-Werten aufgetragen, konnten aber keine sauberen Trennungen erreicht werden. Nach Quervernetzung der Zellhüllen, wandert der Komplex an eine andere Stelle, läßt sich aber nach Spaltung in der zweiten Dimension ebenfalls wieder in die Bindeproteine 3 und 5 auftrennen. Dies zeigt, daß der natürliche Komplex und der chemisch quervernetzte identisch sind. Nach Quervernetzung hat der Komplex einen veränderten isoelektrischen Punkt und läuft daher in der isoelektrischen Fokussierung unterschiedlich.

Da nur sehr wenig Komplex A gebildet wird, zeigt dies, daß nur ein geringer Teil der Bindeproteine 1, 3 und 5 in situ in der Membran als nativer Komplex vorliegen. Es ist denkbar, daß dieser Komplex ständig zerfällt und nur neu gebildet wird, wenn die Proteine in einen funktionellen Zustand übergehen. Die Ausbildung des Komplexes würde so die Aktivitäten der beteiligten Proteine bestimmen. In der Tat können nur funktionelle Komplexe quervernetzt werden, denn in Mutanten mit Temperatur-empfindlichen Binde-Proteinen ist der Komplex nicht nachweisbar.

Der Komplex A enthält drei am Mureinstoffwechsel beteiligte Proteine, ein Protein, das für die generelle Synthese von Murein verantwortlich ist, die bifunktionelle Transglykosylase/Transpeptidase (PBP 1), ein Protein, das spezifisch an der Septumsbildung beteiligt ist (PBP 3) und

ein Protein, das als Carboxypeptidase wesentlich die Menge an Donor-Material (Pentapeptidseitenketten) für die Transpeptidierungsreaktion bestimmt. Damit hat sich die Zelle einen multifunktionellen Komplex bereitgestellt, der gleichzeitig Längenwachstum, Teilungswachstum und die Regulation dieser beiden Prozesse bewirken könnte. Dieser Komplex würde Vorstellungen entsprechen, die aus verschiedenen Untersuchungen zur in vivo Mureinsynthese entwickelt worden sind. Längenwachstum und Teilungswachstum werden zwei verschiedenen Systemen zugeschrieben (23), da sie unabhängig voneinander mit Antibiotika beeinflußt werden können. Septumsbildung scheint von der Menge an Pentapeptid tragenden Mureinvorstufen in der Wachstumszone abhängig zu sein (34). Hohe Carboxypeptidase-Aktivität (PBP 5) stimuliert die Synthese von Septumsmaterial (34). Der Komplex aus den Bindeproteinen 1, 3 und 5 kann also als ein System angesehen werden, das nicht nur Längenwachstum und Teilungswachstum katalysieren kann, sondern auch während des Wachstums der Zelle über die Aktivität des Bindeproteins 5 von Längenwachstum auf Teilungswachstum und umgekehrt umschalten kann. Es wäre interessant, die topologische Verteilung dieses Komplexes in der Membran mit Antikörpern sichtbar zu machen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von bifunktionellen chemischen Protein-Quervernetzungsreagenzien wurde die gegenseitige Anordnung der Penicillin-Bindeproteine in der Cytoplasmamembran von E. coli untersucht. Dabei wurden 16 verschiedene Vernetzungsreagenzien bei verschiedenen Konzentrationen an isolierten Zellhüllen getestet. Mit den Reagenzien, Dithiobis(succinimidyl propionat), Äthylenglykol bis(succinimidyl succinat) und Disuccinimidyl tartarat entstanden 3 Quervernetzungskomplexe; mit Dithiobis (Succinimidyl propionat) wird ein zusätzlicher Komplex mit einem scheinbaren MG von 140 000 Dalton gebildet. Die an diesen 4 Komplexen beteiligten Bindeproteine wurden mit zwei verschiedenen Methoden identifiziert: durch zweidimensionale Gelelektrophorese wobei die Komplexe im Anschluß an die Auftrennung in der 1. Dimension gespalten wurden und durch Verwendung von Mutanten mit defekten Bindeproteinen.

Zwei Komplexe mit scheinbaren Molekulargewichten von 57 000 und 35 000 entstehen wahrscheinlich durch intramolekulare Quervernetzung der Bindeproteine 3 bzw. 5. Die Proteine PBP 1A und 1B bilden einen Komplex mit einem Molekulargewicht von 120 000. An einem weiteren Komplex mit einem Molekulargewicht von 140 000 sind die PBPs 1, 3 und 5 beteiligt. Unter schonenden Solubilisierungsbedingungen konnte dieser Komplex auch ohne vorherige Quervernetzung aus der Membran isoliert werden.

Penicillin-Bindeprotein 1, das für die generelle Mureinsynthese verantwortlich ist, Penicilllin-Bindeprotein 3, das an der Septumsbildung beteiligt ist und Penicillin-Bindeprotein 5, das als Carboxypeptidase die Quervernetzungsreak-

tion reguliert, scheinen einen multifunktionellen Komplex in der Membran auszubilden. Die Bedeutung, die dieser Multienzymkomplex für die Kontrolle der Mureinsynthese haben könnte, wird diskutiert.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdella, P.M., Smith, P.K., and Royer, G.P. (1979). A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins. Biochem.Biophys.Res.Commun. 87, 734-742.

2. Arai, K., Low, R., Kobori, J., Shlomai, J., and Kornberg, A. (1981). Purification and properties of E. coli protein i, a prepriming protein in ϕ X 174 DNA replication. J.Biol.Chem. 256, 5281-5286.

3. Aran, v., Rodriguez-Tebar, A., and Vazquez, D. (1983). Labelling of penicillin-binding proteins from E. coli with photoreactive derivatives of ß-lactam antibiotics. FEBS Lett., 153, 431-437.

4. Beck, B.D. and Park, J.T. (1977). Basis for the observed fluctuation of carboxypeptidase II activity during the cell cycle in BUG 6, a temperature sensitive division mutant of E. coli. J.Bacteriol. 130, 1292-1302.

5. Berger, S.L. (1975). Diethyl pyrocarbonate: An examination of its properties in buffered solutions with a new assay technique. Anal.Biochem. 67, 428-437.

6. Bloch, K. and Vance, D. (1977). Control mecanisms in the synthesis of saturated fatty acids. An.Rev.Biochem. 46, 263-298.

7. Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels. Eur.J.Biochem. 46, 83-88.

8. Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of E. coli. Biochim.Biophys.Acta 415, 335-377.

9. Braun, V., Gnirke, H., Henning, U., and Rehn, K. (1973). Model for the structure of the sphape-maintaining layer of the Escherichia coli cell envelope. J.Bacteriol.114, 1264-1270.

10. Capaldi, R.A. and Green, D.E. (1972). Membrane proteins and membrane structure. FEBS Lett. 25, 205-209.

11. Chang, F.N. and Flaks, J.G. (1972). The specific cross-linking of two proteins from the E. coli 30 S ribosomal subunit. J.Mol.Biol. 68, 177-180.

12. Chong, P.C.S. and Hodges, R.S. (1981). A new heterobifunctional cross-linking reagent for the study of biological interactions between proteins. J.Biol.Chem. 256, 5064-5070.

13. Davies G.E. and Stark, G.R. (1970). Use of dimethyl suberimidate a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. Proc.Natl. Acad.Sci. USA 66, 651-656.

14. De Pedro, M.A. and Schwarz, U. (1981). Heterogeneity of newly inserted and preexisting murein in the sacculus of E. coli. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 5856-5860.

15. De Pedro, M.A., Schwarz, U., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1980). On the biological role of penicillin-binding proteins 4 and 5. FEMS Microbiol.Lett. 9, 219-221.

16. Diopoh, J. and Olomucki, M. (1972). New protein reagents: 4-chloro-3,5-dinitrophenacyl bromide. Biochim.Biophys. Acta 263, 220-225.

17. Endermann, R. and Henning, U. (1978). Nearest neighbors of major proteins in the outer membrane of E. coli K12. FEBS Lett. 97, 339-342.

18. Friedman, M. (1977). Protein crosslinking - biochemical and molecular aspects in Adv. in Experimental Medicine and Biology Vol. 86 A. Plenum Press, New York and London.

19. Glauner, B. (1982). Analyse des Mureins von E. coli mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie: Erste Charakterisierung neuartiger Mureinkomponenten. Dissertation, Universität Tübingen.

20. Haller, I. (1975). Zellhülle und Zellform von E. coli K12: Organisation der Proteine in der äußeren Membran. Dissertation, Universität Tübingen.

21. Hermann, R., Jaenicke, R., Rudolph, R. (1981). Analysis of oligomeric enzymes by cross-linking with glutaraldehyde: Kinetics of reassociation of lactic dehydrogenase. Biochemistry 20, 4195-5201.

22. Höltje, J.-V., Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U. (1975). Novel type of murein trasglycosylase in E. coli. J.Bacteriol. 124, 1067-1076.

23. Höltje, J.-V. and Schwarz, U. (1983). Biosynthesis and growth of the murein sacculus, in Molecular Cytology of

E. coli. N Nanninga Ed., Academic Press (London), in press.

24. Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S., and Matsuhashi, M. (1980). Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of E. coli penicillin-binding proten 1A. Biochem.Biophys.Res. Commun. 97, 287-293.

25. Ishino, F., Matsuhashi, M. (1981). Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in E. coli: A septum-forming reaction sequence. Biochem.Biophys.Res.Commun. 101, 905-911.

26. Iwaya, M. and Strominger, J.L. (1977). Simultaneous deletion of D-alanine carboxypeptidase 1B-C and penicillin-binding component IV in a mutant of E. coli K12. Proc. Natl.Acad.Sci. USA 74, 2980-2984.

27. Keck, W. and Schwarz, U. (1979). E. coli murein-DD-endopeptidase insensitive to ß-lactam antibiotics. J.Bacteriol. 139, 770-774.

28. Klencke, S. (1979). Genetische und physiologische Charakterisierung von Mutanten von E. coli PA 3092 mit einem Defekt der N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase. Dissertation, Universität Tübingen.

29. Lomant, A.J. and Fairbanks, G. (1976). Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent ^{35}S

Dithiobis (succinimidyl propionate). J.Mol.Biol. 104, 243-261.

30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275.

31. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., and van Alphen, L. (1975). Electrophoretic reslution of the "major outer membrane protein" pf E. coli K 12 into four bands. FEBS Lett. 58, 254-258.

32. Lutter, L.C., Ortanderl, F. and Fasold, H. (1974). The use of a new series of cleavable protein-crosslinkers on the E. coli ribosome. FEBS Lett. 48, 288-292.

33. Marinetti, G.V., Baumgarten, R., Sheeley, D., and Gordesky, S. (1973). Cross-linking of phospholipids to proteins in the erythrocyte membrane. Biochem.Biophys. Res.Commun. 53, 302-307.

34. Markiewicz, Z., Broome-Smith, J.K., Schwarz, U., and Spratt, B.G. (1982). Spherical E. coli due to elevated levels of D-alanine carboxypeptidase. Nature (London) 297, 702-704.

35. Matsuhashi, M., Takogaki, Y., Maruyama, I.N., Tamaki, S., Nishimura, Y., Suzuki, H., Ogino, U., and Hirota, Y. (1977). Mutants of E. coli lacking in highly penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. Proc.Natl. Acad.Sci.USA 74, 2976-2979.

36. Matsuhashi, M., Tamaki, S., Curtis, S.J., and Strominger,

J.L. (1979). Mutational evidence for identity of penicillin-binding protein 5 in E. coli with the major D-alanine carboxypeptidase IA activity. J.Bacteriol. 137, 644-647.

37. Mett, H., Keck, W., Funk, A., and Schwarz, U. (1980) Two different species of murein transglycosylase in E. coli. J.Bacteriol. 144, 45-52.

38. Nakagawa, J., Tamaki, S., and Matsuhashi, M. (1979). Purified penicillin binding proteins IBs from E. coli membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. Agric. Biol.Chem. 43, 1379-1380.

39. O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J.Biol.Cchem. 250, 4007-4021.

40. Osborn, M.J., Gander, J.E. Parisi, E., and Carson, J. (1972). Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J.Biol.Cehm. 247, 3962-3972.

41. Palva, E.T., Randall, L.L. (1979). Cross-linking analysis of the two forms of protein I, a major outer membrane protein of E. coli. J.Bacteriol. 138, 254-256.

42. Pelzer, H. (1963). Muropeptidhydrolasen in E. coli B. Z.Naturforsch. 18b, 950-964.

43. Peters, K. and Richards, F.M. (1977). Chemical cross-linking: Reagents and problems in studies of membrane structure. Ann.Rev.Biochem. 46, 523-551.

44. Primosigh, J., Pelzer, H., Maass, D., and Weidel, W.

(1961). Characterization of muropeptides released from the E. coli B cell wall by enzymic action. Biochim.Biophys.Acta 46, 68-80.

45. Reithmeier, R.A.F. and Bragg, P.D. (1977). Cross-linking of the proteins in the outer membrane of E. coli. Biochim.Biophys.Acta 466, 245-256.

46. Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B. (1980). In Microbial Cell Walls and Membranes, pp. 342. University Press, Cambridge.

47. Schwarz, U., Seeger, K., Wengenmayer, F., and Strecker, H. (1981). Penicillin-binding proteins of E. coli identified with a ^{125}I-derivative of ampicillin. FEMS Lett. 10, 107-109.

48. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731.

49. Smith, R.J., Capaldi, R.A., Muchmore, D., and Dahlquist, F. (1978). Cross-linking of ubiquinone cytochrome C reductase (complex III) with periodate-cleavable bifunctional reagents. Biochemistry 17, 3719-3723.

50. Spratt, B.G. (1977). Properties of the penicillin-binding proteins of E. coli K 12. Eur.J.Biochem. 72, 341-352.

51. Spratt, B.G. and Pardee, A.B. (1975). Penicillin-binding proteins and cell-shape in E. coli. Nature 254, 516-517.

52. Spratt, B.G., Jobanputra, V., and Schwarz, U. (1977). Mutants of E. coli wich lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. FEBS Lett. 79, 374-378.

53. Spratt, B.G. and Strominger, J.L. (1976). Identification of the major penicillin-binding proteins of E. coli as D-alanine carboxypeptidase IA. J.Bacteriol. 127, 660-663.

54. Spratt, B.G. (1978). E. coli resistance to ß-lactam antibiotics through a decrease in the affinity of a target for lethality. Nature 274, 713-715.

55. Spratt, B.G. (1975). Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of E. coli K 12. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 2999-3003.

56. Suzuki, H., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978). On the process of cellular division in E. coli: A series of mutants of E. coli altered in the penicillin-binding proteins. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 664-668.

57. Suzuki, H., van Heijenoort, Y., Tamura, T., Mizoguchi, J., Hirota, Y., and van Heijenoort J. (1980). in vitro peptidoglycan polymerization catalyzed by penicillin binding protein 1B of E. coli K 12. FEBS Lett. 110, 245-249.

58. Tamaki, S., Nakajima, S., and Matsuhashi, M. (1977). Thermosensitive mutation in E. coli simultaneously causing defects in penicillin-binding proteins IBs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 5472-5476.

59. Tamaki, S., Nakagawa, J., Maruyama, I.N., and Matsuhashi, M. (1978). Supersensitivity to ß-lactam antibiotics in E. coli caused by D-alanine carboxypeptidase IA mutation. Agric.Biol.Chem. 42, 2147-2150.

60. Tamura, T., Imae, Y., and Strominger, J.L. (1976). Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidase I from E. coli. J.Biol.Chem. 251, 414-423.

61. Tamura, T., Suzuki, H., Nishimura, Y., Mizoguchi, J., and Hirota, Yl (1980). On the process of cellular division in E. coli: Isolation and characterization of penicillin-binding proteins la, lb, and 3. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 77,4499-4503

62. Tomioka, S. and Matsuhashi, M. (1978). Purification of penicillin-insensitive DD-endopeptidase, a new cell wall peptidoglycan-hydrolyzing enzyme in E. coli and its inhibition by DNA. Biochem.Biophys.ResComm. 84, 978-984.

63. Van Heijenoort, J, Parquet, C., Flouret, B., and van Heijenoort Y. (1975). Envelope-bound N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of E. coli K 12. Eur.J.Biochem. 58, 611-619.

64. Verwer, R.W.H., Nanninga, N., Keck, W., and Schwarz, U. (1978). Arrangement of glycan chains in the sacculus of E. coli J.Bacteriol. 136, 723-729.

65. Vogel, H. and Bonner, D.M. (1956). Acetylornithinase of E. coli: Partial purification and some properties. J.Biol.Chem. 218, 97-105.

66. Wallenfels, B. (1979). Developmental and mutational changes of glycoproteins in the mouse neuronal retina: Studies with bovine galactosyltransferase. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 3223-3227.

67. Wang, K. and Richards, F.M. (1974). An approach to nearest neighbour analysis of membrane proteins. J.Biol.Chem. 249, 8005-8018.

68. Weidel, W. and Pelzer, H. (1964). Bagshaped macromolecules - A new outlook on bacterial cell walls. Adv. Enzymol. 26, 193-232.

LEBENSLAUF

Name:	Ibrahim Abdelrahman Mohamed Said
Geboren:	28.9.1949 in Kairo, Ägypten

Schulausbildung

1955-1961	Volksschule-Benisuif-Ägypten
1961-1964	Mittelschule-Benisuif-Ägypten
1964-1967	Gymnasium-Kairo-Ägypten mit Abiturabschluß

Studium

1967-1971	Studium der Pflanzenpathologie an der Ain-Shams Universität Kairo
1972-1973	Studium der englichen und deutschen Sprache in England bzw.Berlin
1974-1978	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim-Stuttgart. Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: Wirkung neurer Fungizide gegen verschiedene Baumwollkrankheiten
1979-1980	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Biologie an der Universität Kaiserslautern

Dissertation

1980-1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, unter Anleitung von Herrn Dr. Uli Schwarz und Dr. Joachim-Volker Höltje.

MEINE AKADEMISCHEN LEHRER WAREN:

W. Achtnich

E. Becker

V. Braun

E. Bruchman

P. Pfaender

F. Großmann

D. Heß

J. Koch

W. Koch

K. Kreeb

F. Lingens

W. Loeffler

B. Ohnesorge

R. Plapp

P. Renz

G. Siebert

H. Zähner

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353